

**Molekulare Untersuchung zweier Belebtschlammanlagen
unter besonderer Berücksichtigung
der biologischen Phosphorelimination**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

an der

Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von

Dipl.-Biol. M. Eschenhagen

Gutachter: Prof. Dr. habil. I. Röske (TU Dresden)

Prof. Dr. habil. D. Uhlmann (TU Dresden)

Prof. Dr. habil. S. Würtz (University of California)

Tag der Einreichung: 26.11.2003

Tag der Verteidigung: 30.04.2004

INHALTSVERZEICHNIS:

1	Einleitung	5
2	Zielsetzung	7
3	Grundlagen	9
3.1	Analyse von Bakterienbiozöten natürlicher Habitate	9
3.2	Die erhöhte biologische Phosphat-Elimination in der Abwasserbehandlung	13
3.2.1	Biologische Grundlagen	13
3.2.2	Polyphosphatakkumulierende Organismen (PAO) im Belebtschlamm	16
3.2.2.1	<i>Rhodocyclus</i> -Gruppe (β -Proteobakterien)	17
3.2.2.2	<i>Acinetobacter</i> spec. (γ -Proteobakterien)	18
3.2.2.3	<i>Lampropedia</i> spec. (γ -Proteobakterien)	19
3.2.2.4	Unbekannte Gruppe innerhalb der γ -Proteobakterien	19
3.2.2.5	<i>Tetrasphaera</i> spec. und <i>Microlunatus phosphorus</i> (Gram-positive Bakterien)	19
3.2.2.6	Fadenförmige GRAM-positive Bakterien	20
3.3	Nitrifikation in der Abwasserreinigung	20
4	Material und Methoden	23
4.1	Aufbau und Betrieb der Versuchsanlagen	23
4.1.1	Verfahrenstechnische Parameter	23
4.1.2	Aufbau der A/O- und der AS-Anlage	23
4.1.3	Aufbau der Phoredox-Anlage	24
4.2	Untersuchte Kläranlagen	25
4.2.1	Kläranlage Dresden-Kaditz	25
4.2.2	Kläranlage Bad Liebenwerda	26
4.2.3	Kläranlage Elsterwerda	26
4.3	Vergleich der untersuchten Anlagen	27
4.3.1	Gegenüberstellung der verfahrenstechnischen Parameter	27
4.3.2	Gegenüberstellung der Abwasserzusammensetzung	28
4.4	Routineanalytik	30
4.5	Batch-Versuche zur P-Freisetzung aus dem Belebtschlamm	31
4.6	P-Fraktionierung nach Psenner	32

4.7	Mikroskopische Untersuchungen	33
4.7.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl	33
4.7.2	Nachweis der Polyphosphatgranula	33
4.7.3	Differenzierung der fadenförmigen Bakterien	33
4.8	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	34
4.8.1	Beschichten der Objektträger	34
4.8.2	Fixierung der Belebtschlammproben	34
4.8.3	Immobilisieren der Zellen	34
4.8.4	Hybridisierung der Belebtschlammproben	35
4.8.5	Verwendete Oligonukleotidsonden	36
4.8.6	Gegenfärbung mit DAPI	37
4.8.7	Mikroskopische Auswertung	37
4.9	PCR-Analyse	38
4.9.1	DNA-Isolierung aus Belebtschlamm	38
4.9.2	Quantitative Analyse der extrahierten DNA	39
4.9.3	DNA-Amplifikation mittels PCR	39
4.9.3.1	Universelle-PCR	41
4.9.3.2	Spezifische PCR für die Ammonium-Monooxygenase	41
4.9.3.3	Amplifikation der Plasmid-Inserts	42
4.9.4	Nachweis der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	42
4.9.5	Klonierung	42
4.9.6	Sequenzierung	43
4.9.6.1	Zyklische Sequenzierung	43
4.9.6.2	Vergleichende 16S rDNA Analyse	44
4.9.7	T-RFLP-Analyse	44
5	Ergebnisse und Diskussion	47
5.1	Reinigungsleistungen der untersuchten Anlagen	47
5.1.1	Reinigungsleistung der Versuchsanlagen	47
5.1.1.1	A/O-Anlage	47
5.1.1.2	AS-Anlage, ohne Anaerobbecken	48
5.1.1.3	Phoredox-Anlage	49
5.1.2	Reinigungsleistung der kommunalen Kläranlagen	50
5.1.2.1	KA Bad Liebenwerda	50
5.1.2.2	KA Elsterwerda	51
5.1.2.3	KA Kaditz	52

5.2	Untersuchungen zur biologischen Phosphor-Elimination	53
5.2.1	P-Freisetzungsraten in den Versuchsanlagen	53
5.2.2	Abhängigkeit der P-Freisetzung von der Temperatur	53
5.2.3	Batchversuche zur Bestimmung der P-Freisetzungs- und P-Aufnahmeraten	54
5.2.4	P-Fraktionierung	56
5.3	Potentieller Anteil der <i>Rhodocyclus</i> -Gruppe an der Phosphat-Freisetzung	57
5.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl	59
5.5	Mikrobielle Charakterisierung der Belebtschlämme	59
5.5.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	59
5.5.1.1	Eubakterien-Sonde (EUB338-I)	60
5.5.1.2	Gruppenspezifische Sonden	62
5.5.1.3	Einfluss der Temperatur auf die mikrobielle Zusammensetzung	68
5.5.1.4	Polyphosphat speichernde Bakterien (PAO)	69
5.5.1.4.1	Vertreter der Gattung <i>Tetrasphaera</i>	69
5.5.1.4.2	Vertreter der Gattung <i>Rhodocyclus</i>	71
5.5.1.4.3	Vertreter der Gattung <i>Acinetobacter</i>	75
5.5.1.5	Ammonium oxidierende Bakterien	75
5.5.1.6	Das Phylum <i>Planctomycetes</i>	78
5.5.1.7	Grüne Schwefelfreie Bakterien (<i>Green non sulfur bacteria</i>)	79
5.5.2	Universelle und amoA-spezifische PCR	80
5.5.3	T-RFLP-Analyse	80
5.5.3.1	Versuchsanlagen	81
5.5.3.2	Kommunale Kläranlagen	84
5.5.3.3	Vergleich der T-RFLP-Ergebnisse mit den 16S rRNA-Genbibliotheken	86
5.5.4	Vergleichende 16S rDNA-Analyse	87
5.5.4.1	Versuchsanlagen	87
5.5.4.2	Kommunale Kläranlagen	92
5.5.4.3	Vergleich mit Literaturwerten	94
5.5.5	Spezifische PCR für Ammonium oxidierende Bakterien	96
5.5.6	Klonierung der AOB-spezifischen PCR-Produkte	96
5.5.7	Vorkommen von fadenförmigen Bakterien	100
5.5.7.1	Bestimmung der Fädigkeit nach EIKELBOOM & VON BJUISEN	100
5.5.7.2	Spezifische Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	101
6	Zusammenfassung	104
7	Literaturverzeichnis	110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

AOB	Ammonium oxidierende Bakterien
amoA	Gen der α -Untereinheit der Ammoniak-Monooxygenase
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bicarbonat-Dithionit-Fraktion
bp	Basenpaare
BSB ₅	Biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
CFB	Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindolhydrochlorid
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBPR	Enhanced Biological Phosphorus Removal
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EWG	Einwohnergleichwerte
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybrisierung
GNSB	Grüne Schwefelfreie Bakterien (Green non sulfur bacteria)
KA	Kläranlage
NRP	Nicht löslicher reaktiver Phosphor (Non Soluble Reactive Phosphorus)
oTS	Organische Trockensubstanz
OTU	Operational Taxonomic Unit
PAO	Phosphat akkumulierende Organismen
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered salt solution)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PHA	Polyhydroxyalkonoate
PHB	Polyhydroxybutyrat
pmoA	Gen der α -Untereinheit der partikulären Methan-Monooxygenase
rDNA	Ribosomale DNA
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SBR	Sequencing batch reactor
SRP	Löslicher reaktiver Phosphor (Soluble Reactive Phosphorus)
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
P _{ges.}	Gesamt-Phosphor
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TS	Trockensubstanz

1 EINLEITUNG

Trotz des erfolgreichen weltweiten Einsatzes der Belebtschlammverfahren zur Reinigung von kommunalem und industriellem Abwasser ist wenig über die Zusammensetzung der beteiligten mikrobiellen Biozönosen bekannt. Dies gilt insbesondere für die Gruppe der Bakterien, die für die erhöhte biologische Phosphatelimination verantwortlich sind.

Erste Belebtschlammanlagen wurden schon Anfang des 20. Jahrhunderts von Arden und Lockett mit dem Ziel einer Verminderung der Konzentration an pathogenen Keimen und organischen, sauerstoffzehrenden Stoffen eingeführt.

Auch gegenwärtig ist die kommunale Abwasserreinigung von großer Bedeutung für den Gewässerschutz und somit für den Schutz der Trinkwasser-Ressourcen. Sie hat die Aufgabe, Schäden durch Abwassereinleitungen zu vermeiden bzw. zu vermindern, da eine unbedachte Nutzung und Verschmutzung von Wasser letztlich zu einer Schädigung der Natur und zu einer Verknappung der Ressource Wasser führt (MUDRACK UND KUNST, 1991).

Im Jahr 2001 waren in Deutschland ca. 93% der Bevölkerung an zentrale öffentliche Kläranlagen mit oder ohne gezielte Nährstoffelimination angeschlossen. Das anfallende Abwasser (ca. 10,5 Mrd. m³) wurde zu fast hundert Prozent in biologischen Abwasserbehandlungsanlagen gereinigt (Statistisches Bundesamt, 2003).

Aufgrund der stetig steigenden Anforderungen an den Gewässerschutz und der zugrundeliegenden Verschärfungen der gesetzlichen Auflagen werden immer höhere Anforderungen an die Effektivität der Abwasserreinigungsanlagen gestellt. Die Zielvorgabe des Gesetzgebers, in allen Gewässern die Gewässergüte-Klasse II zu erreichen, erfordert auch eine Verringerung der eutrophierenden Phosphat- und Stickstoffverbindungen sowie einen Rückhalt toxischer Stoffe (MUDRACK UND KUNST, 1991). Dabei stellt unter europäischen Klimabedingungen das anorganische gelöste Phosphat in den meisten vom Abwasser unbeeinflussten Gewässern den produktionsbegrenzenden Nährstoff dar (UHLMANN, 1988 und 2001; SCHWOERBEL, 1987 RÖSKE et al., 1995).

In der bundesweit geltenden Abwasserverordnung (Oktober 2002, Anhang 1: Häusliches und kommunales Abwasser) sind die Grenzwerte für die organische Fracht (CSB, BSB₅), für Ammonium- und Gesamtstickstoff sowie für Phosphat in Abhängigkeit von der Größenklasse der Kläranlagen festgelegt. So gilt für Anlagen ab der Größenklasse 3, d.h. >300 kg BSB₅ (roh) d⁻¹, ein Grenzwert für Ammonium von 10 mg l⁻¹ NH₄-N. Für die Größenklasse 4 und 5 gelten zudem Grenzwerte für Gesamtstickstoff von 18 bzw. 13 mg l⁻¹ und für Phosphat von 2 bzw. 1 mg PO₄-P l⁻¹).

Aufgrund der gesetzlichen Maßnahmen und der Einführung der dritten Reinigungsstufe konnte in Deutschland die Stickstoffemission in Oberflächengewässer durch kommunales Abwasser von 300.000 t a⁻¹ (1975) auf ca. 100.000 t a⁻¹ (2000) reduziert werden, die Phosphoremission sogar von 80.000 t a⁻¹ (1975) auf unter 10.000 t a⁻¹ (2000) (Abbildung 1.1).

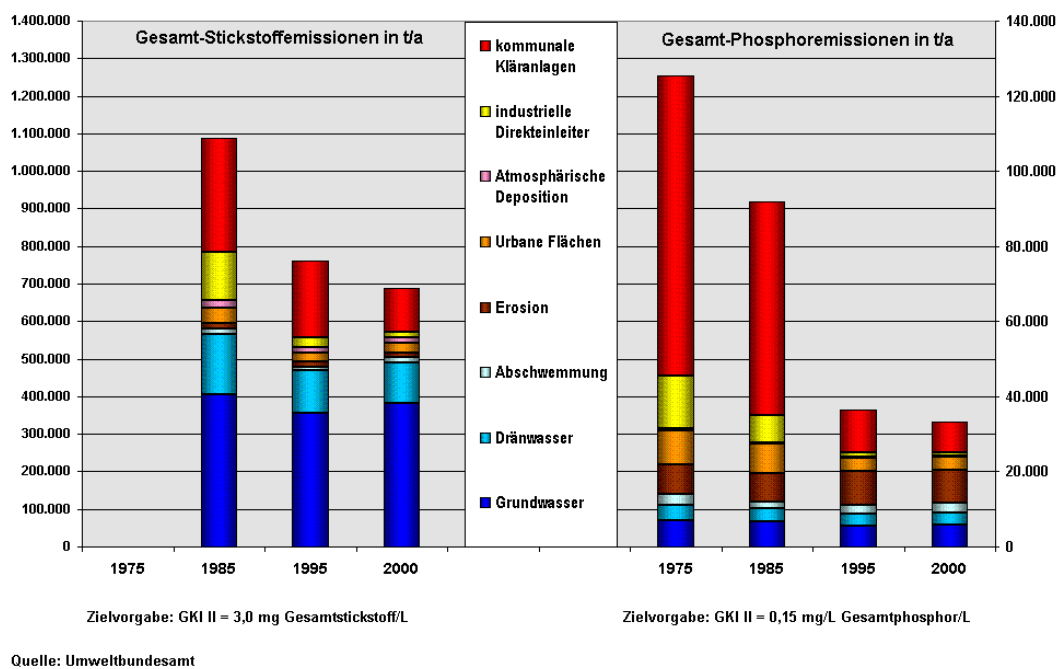


Abbildung 1.1: Stickstoff- und Phosphoremission in Oberflächengewässer der BRD (Quelle: Umweltbundesamt)

Die Verschärfung der gesetzlichen Auflagen führte jedoch zu erheblichen technischen Nach- und Umrüstungen der Kläranlagen und zu einer Optimierung der Verfahren. Die verschiedenen Stickstoffverbindungen, die mit dem Abwasser vor allem in Form von Proteinen und Harnstoff bzw. als Ammonium in die Reinigungsanlagen gelangen, werden heute vor allem durch eine Kombination aus biologischer Nitrifikation und Denitrifikation zu molekularem Stickstoff reduziert und so aus dem Abwasser entfernt (LEMMER, 1996).

Im Gegensatz dazu können die Phosphorverbindungen, die im Abwasser gelöst vorliegen, erst aus dem Abwasser entfernt werden, wenn sie in eine unlösliche Form überführt werden. Dies ist zum einen durch eine chemische Fällung mittels $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bzw. Fe^{2+} -, Fe^{3+} - oder Al^{3+} -Salzen (UHLMANN, 1988; SCHÖNBORN, 1998; ATV, 1992) möglich, die mittels einer online-Steuerung auch bei kurzzeitigen Schwankungen der Phosphor-Konzentration verfahrenstechnisch sehr sicher ist.

Jedoch führt die Zudosierung von Fällungsmitteln zu einer Aufsalzung des Abwassers und somit des Vorfluters. Zudem erhöhen sich die Betriebskosten aufgrund der Kosten für die Fällungsmittel und der Entsorgung des zusätzlichen Überschussschlammes (ca. 25% mehr).

Aufgrund dieser ökonomischen und ökologischen Gründe werden seit ca. 25 Jahren zunehmend alternative biologische Verfahren eingesetzt. Bei dieser biologischen Phosphorelimination wird das Phosphat durch eine Modifizierung des Belebtschlammverfahrens, d.h. einen Wechsel zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen, in den Bakterienzellen in Form von Polyphosphatgranula gespeichert und mit dem Überschussschlamm aus dem System entfernt (Schön, 1994).

Für eine Optimierung derartiger biologischer Verfahren in Hinblick auf Effizienz und Stabilität ist jedoch das Verständnis der mikrobiellen Vorgänge und der daran beteiligten Organismen sehr wichtig. Trotz des langjährigen Einsatzes dieser Verfahren ist nicht bekannt, welche Bakterien für die erhöhte biologische Phosphatelimination verantwortlich sind.

Erste mikrobiologische Untersuchungen, die mit Hilfe von klassischen Verfahren, basierend auf einer Isolierung und Kultivierung der Keime, durchgeführt wurden, deuteten auf eine Dominanz der Gattung *Acinetobacter* in Anlagen mit einer erhöhten biologischen Phosphatelimination hin (FUHS & CHEN, 1975). Erst durch den Einsatz von kultivierungsunabhängigen Untersuchungsmethoden, wie z.B. der Anwendung von spezifischen Antikörpern bzw. der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, konnte gezeigt werden, dass die Gattung *Acinetobacter* durch das verwendete Kultivierungsmedium selektiert wurde und andere Mikroorganismen für die erhöhte Polyphosphatelimination verantwortlich sein müssen (WAGNER, 1995). Trotz umfangreicher Forschung unter Einsatz verschiedenster kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Methoden ist es bisher noch nicht gelungen, die mikrobiologischen Zusammenhänge der biologischen Phosphatelimination zu klären.

2 ZIELSETZUNG

Aufgrund der ökologischen und ökonomischen Problematik der chemischen Phosphatfällung ist eine Optimierung der Effizienz und Stabilität der biologischen Verfahren zur Phosphatelimination erforderlich. Hierfür ist jedoch ein fundiertes Wissen über die daran beteiligten Organismen eine entscheidende Voraussetzung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mikrobielle Populationstruktur von zwei Belebtschlammmanlagen im Labormaßstab mit Hilfe von drei unterschiedlichen 16S rDNA basierten molekularbiologischen Methoden zu charakterisieren. Ein besonderer Schwerpunkt ist hierbei die Analyse der Bakterien, die mit der erhöhten biologischen Phosphatelimination in Verbindung gebracht werden. Dies sind Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe, der Gattung *Tetrasphaera* und der Gattung *Acinetobacter*.

Als Untersuchungsobjekte wurden zwei Hauptstromverfahren zur erhöhten biologischen Phosphatelimination gewählt, die sich im Schlammalter, der Schlammbelastung und der sich daraus resultierenden Nitrifikationsleistung unterscheiden. Aufgrund der gewählten Verfahrensweisen wurde der Einfluss der Nitrifikation auf die Zusammensetzung der Belebtschlammbiozönose ebenfalls untersucht. Um praxisnahe Verhältnisse zu erreichen, wurden die Anlagen mit kommunalem Abwasser beschickt. Für einen Vergleich sollten Proben aus kommunalen Kläranlagen mit deutlich anderen Verfahrensweisen in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Bezüglich der Zielstellung der Arbeit, d.h. der Differenzierung der mikrobiellen Belebtschlamm-biozöten, ergaben sich folgende Fragestellungen:

- ⇒ Gibt es aufgrund der Verfahrensweisen Unterschiede in der Phosphatfreisetzung und -aufnahme der untersuchten Belebtschlämme?
- ⇒ Bilden sich aufgrund der gewählten Verfahrensweisen der Versuchsanlagen in den Belebtschlämmen unterschiedliche mikrobielle Biozöten aus? Sind diese mit den verwendeten Methoden zu differenzieren?
- ⇒ Können mit Hilfe der eingesetzten Methoden im Verlauf des Untersuchungszeitraumes strukturelle Veränderungen innerhalb der Belebtschlamm-biozöten nachgewiesen werden? Welche Aussagen lassen diese über die „Stabilität“ der Biozöte zu?
- ⇒ Welche Bakterien sind in den beiden Laboranlagen mit unterschiedlicher Betriebsweise (A/O-Verfahren und Phoredox-Verfahren) für die erhöhte biologische Phosphatelimination verantwortlich? Gibt es Unterschiede zwischen den beiden Laboranlagen?
- ⇒ Treten Unterschiede in der mikrobiellen Struktur im Vergleich zu den großtechnischen kommunalen Kläranlagen auf? Lassen sich Korrelationen zu verfahrenstechnischen Parametern finden?

Die erzielten Ergebnisse sollen unter Berücksichtigung systematischer Fehler der verwendeten Methoden diskutiert und miteinander verglichen werden.

3 GRUNDLAGEN

3.1 Analyse von Bakterienbiozöten natürlicher Habitate

Für das Verständnis mikrobiologischer Vorgänge in natürlichen und anthropogen beeinflussten Habitaten, sowie in biotechnologischen Systemen, wie z.B. Biofilm- und Belebtschlammanlagen in der Abwasserreinigung, ist das Wissen über die Zusammensetzung der daran beteiligten Mikroflora von großer Bedeutung.

Die Analyse solcher Biozöten erfolgte bis in die 80er-Jahre mit Hilfe von kultivierungsabhängigen Verfahren, wie z.B. der Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ), der Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (KbE) sowie der Isolierung von einzelnen Arten in Reinkulturen mit anschließender morphologischer und biochemischer Charakterisierung (BUCHAN, 1981; RÖSKE, 1987, HELMER, 1994). Des Weiteren wurden wichtige physiologische Gruppen, wie z.B. die Nitrifikanten, durch die Bestimmung der **Most Probable Number** (MPN) auf selektiven Medien quantifiziert und charakterisiert (IKUTA et al., 2000; VESTER & INGVORSEN, 1998).

Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass nur ca. 0,1-10% der Organismen aus natürlichen Habitaten im Labor kultiviert werden können (PICKUP, 1991; WAGNER et al., 1994; AMANN et al., 1995). Zudem werden bei einer Kultivierung von Umweltproben nur die Bakterien detektiert und isoliert, die unter den gegebenen Bedingungen wachsen können. Folglich kommt es aufgrund der Nährstoff- und Kultivierungsbedingungen zu einer Selektion bestimmter Organismen und zu einer quantitativen Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung (WAGNER et al., 1994). Die kultivierten Organismen repräsentieren somit häufig nicht die tatsächliche Populationsstruktur (WAGNER et al., 1994).

Es wurden daher kultivierungs-unabhängige Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Diversitäten gesucht. Hierbei haben sich in den letzten Jahren vor allem molekularbiologische Methoden, die die ribosomale RNA als Zielmolekül besitzen, als geeignet erwiesen. Die ribosomale RNA (rRNA) wurde von WOESE et al. (1985) als phylogenetischer Marker erkannt und als Grundstein der Systematik in der Biologie eingesetzt.

Sie ist hierfür aufgrund verschiedener Eigenschaften besonders geeignet (Woese, 1987). So kommt die rRNA als essentieller Bestandteil der Ribosomen, die durch ihre Funktion eine hohe evolutionäre Stabilität aufweisen, in allen Organismen vor. Die 16S- und 23S-rRNA besitzen mit einer Länge von ~1500 und ~3000 Nukleotiden und ihren konservativen und variablen Bereichen einen hohen Informationsgehalt. Durch diese verschiedenen Bereiche lassen sich Verwandtschaften auf unterschiedlichem phylogenetischen Niveau untersuchen (PACE et al., 1986). Zudem steht durch die Entwicklung der PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, SAIKI et al., 1988) und durch immer bessere Sequenzierungstechniken eine schnell steigende Anzahl an 16S rRNA-Sequenzen in Datenbanken für einen Sequenzvergleich und eine phylogenetische Einordnung neuer Sequenzen zur Verfügung.

Eine der Methoden, welche die rRNA als direktes Zielmolekül nutzt, stellt die **Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung** (FISH) dar. Sie wurde Ende der 80er-Jahre beschrieben (DELONG et al., 1989; AMANN et al., 1990; DEVEREUX et al., 1992). Für diese Methode ist eine vorherige Kultivierung und Isolierung von Mikroorganismen nicht erforderlich. Sie erlaubt somit auch eine phylogenetische Identifizierung von bisher nicht-kultivierten Arten von Mikroorganismen (AMMAN et al., 1990).

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung werden fluoreszenzmarkierte Oligo- bzw. Polynukleotidsonden eingesetzt (PERNTHALER et al., 2001), die eine Sequenz besitzen, die komplementär zu spezifischen Regionen der rRNA (16S und 23S) ist. Die große Anzahl an Zielmolekülen, d.h. ca. 10^2 - 10^5 Ribosomen pro Zelle, führt zu einer Verstärkung der Fluoreszenzsignale. Neben den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen stehen weitere Marker-Moleküle, wie z.B. Dioxigenin oder Goldpartikel, für diese Technik zur Verfügung (Zarda, 1999).

Durch die Auswahl einer geeigneten Oligonukleotidsequenz ist es möglich, Bakterien auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen, wie z.B. auf Spezies-, Gattungs- oder Domänenniveau einzuordnen (AMANN & LUDWIG, 1994; AMMAN et al., 1995). Durch eine Kombination von Oligonukleotidsonden unterschiedlicher Spezifität ist eine weitere taxonomische Differenzierung möglich.

Im Gegensatz zu den PCR-basierten Verfahren (s.u.) stellt die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ein Verfahren zur quantitativen Analyse von mikrobiellen Biozönosen dar. Zudem sind mit dieser Methode bei Anwendung auf nicht homogenisierte Proben, d.h. *in situ*, Aussagen über die räumliche Verteilung der Bakterien in ungestörten Systemen, wie z.B. Biofilmen oder in Belebtschlammflocken, möglich.

Da der Ribosomengehalt einer Zelle mit der Wachstumsrate μ korreliert, sind anhand der Signalstärke der Fluoreszenz Aussagen über den physiologischen Zustand der Zelle möglich (SCHAECHTER et al., 1958; DELONG et al., 1989; WALLNER et al., 1993).

Wie jede Methode besitzt auch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ihre Grenzen. So kann aufgrund von unspezifischen Bindungen der Oligonukleotidsonden bzw. einer Eigenfluoreszenz des Untersuchungsmaterials die Auswertung stark beeinträchtigt werden (AMANN, 1995). Zudem besitzen die Bakterien in vielen Ökosystemen, wie z.B. in Böden und aquatischen Systemen, aufgrund ihres physiologischen Zustandes oftmals eine zu geringe Konzentration an Ribosomen, wodurch die Detektion der Bakterien durch die schwachen Fluoreszenzsignale erschwert wird. Die Nachweisgrenze liegt nach Angaben von AMANN & LUDWIG (1994) bei $>10^3$ Ribosomen/Zelle.

Die Zugänglichkeit der Ribosomen für die Oligonukleotidsonden stellt ein weiteres Problem bei der Analyse von Umweltproben dar. Vor allem bei GRAM-positiven Bakterien, wie z.B. den nocardioformen Actinomyceten, wird die Permeation der Oligonukleotidsonden in die Zelle durch die Zellwandstruktur stark behindert. Diese Bakterien können ohne eine vorherige Behandlung, z.B. mit Antibiotika (BEIMFOHR et al., 1993; SCHUPPLER et al., 1998), nicht vollständig quantifiziert werden. Eine enzymatische Vorbehandlung der gesamten Proben würde jedoch durch eine Lyse sensibler Zellen zu einer quantitativen Verschiebung führen. Daher kommt es bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zu einer Unterschätzung von GRAM-positiven Bakterien.

Ein weiteres *in situ* Verfahren stellt die immunologische Detektion mit markierten Antikörpern dar. Aufgrund einer Reihe von Faktoren, wie z.B. das Auftreten von Kreuzreaktionen, der fehlenden Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen, der sterischen Behinderung der Diffusion und der unspezifischen Bindung an abiotisches Material, ist dieses Verfahren jedoch nur bedingt für die Analyse von Umweltproben geeignet. Zudem ist eine vorhergehende Kultivierung eines verwandten Mikroorganismus erforderlich, weshalb die Detektion von Umweltkeimen nur bedingt möglich ist. Im medizinischen Bereich findet diese Methode demgegenüber bereits eine breite Anwendung.

Neben den *in situ* Techniken werden heute vor allem PCR-basierte Verfahren zur Charakterisierung von mikrobiellen Biozönosen eingesetzt. So können durch die Erstellung von 16S rRNA-Genbibliotheken genaue phylogenetische Informationen über die taxonomische Zusammensetzung einer Biozönose gewonnen werden. Da für eine statistische Absicherung der Vollständigkeit dieser Genbibliotheken eine sehr große Anzahl an analysierten Klonen notwendig ist, eignet sich diese Technik aufgrund des zeitlichen und technischen Aufwandes nur bedingt für die routinemäßige Analyse (MUYZER, 1999).

Deshalb wurden verschiedene genetische Fingerprint-Techniken entwickelt, die relativ einfach und schnell durchzuführen sind und es erlauben, eine größere Anzahl an Proben parallel zu analysieren und miteinander zu vergleichen. Dieser Vorteil ist aber mit einem Verlust an taxonomischer Information und einem geringeren Auflösungsvermögen der Diversität verbunden (MUYZER, 1999; SCHRAMM & AMANN, 1999)

Als Ergebnis liefern sie Profile oder Muster, welche auf der physikalischen Trennung von DNA-Spezies anhand der Ladung und der Größe beruhen (MUYZER, 1999). Als Beispiele seien hier zu nennen die T-RFLP (**T**erminal **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism), die DGGE (**D**enaturing **G**radient **G**el **E**lectrophoresis) und die TGGE (**T**emperature **G**radient **G**el **E**lectrophoresis). Für diese Fingerprint-Techniken können sowohl 16S rDNA PCR-Produkte (LIU et al., 1997; DOLLHOPF et al., 2001) als auch spezifische PCR-Produkte, wie z.B. der *amoA* und *pmoA*-Gene (HORZ et al., 2000 und 2001) oder des Quecksilber-Resistenzgens (BRUCE, 1998), eingesetzt werden.

Obwohl die 16S rRNA-Genbibliotheken und die beschriebenen Fingerprint-Techniken wichtige Instrumente zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität sind, kann aufgrund von systematischen Fehlern bei der DNA-Isolierung und -Amplifikation keine quantitative Analyse der Diversität anhand der Häufigkeit von 16S rDNA-Sequenzen in den Genbibliotheken bzw. der Peakhöhe oder Bandenstärke bei den Fingerprint-Techniken durchgeführt werden (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; WINTZINGERODE et al., 1997; JURETSCHKO et al., 1998; DAIMS, 2001). Zudem ist bei der Auswertung der Profile bzw. der Muster der Fingerprint-Techniken die Zuordnung eines Organismus zu einer Bande nicht immer möglich, da Bakterienspezies eine unterschiedliche Anzahl an rDNA Genen besitzen, deren Sequenzen nicht identisch sein müssen, (AMANN et al., 1996).

Aufgrund der Limitierungen der einzelnen Verfahren sollte für die Differenzierung einer Umweltprobe eine Kombination verschiedener Techniken eingesetzt werden. So kann durch eine optimale Anpassung der Kultivierungsverfahren an die gegebenen Bedingungen der Prozentsatz an kultivierbaren Mikroorganismen erhöht werden. Mit diesen Organismen sind weitergehende Untersuchungen zu den StoffwechsellLeistungen möglich.

Durch Erstellung von 16S rRNA Genbibliotheken sind anhand der gefundenen Sequenzen erste Aussagen über die beteiligten Organismen möglich. Die Abundanz dieser Organismen und damit die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose lässt sich mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung quantifizieren. Durch eine Kombination der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit anderen Verfahren wie der Mikroautoradiographie sind weitere Aussagen über spezielle Umsatzleistungen und die daran beteiligten Organismen möglich. Die Anwendung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der Fingerprint-Techniken erlauben zudem eine Beobachtung von Veränderungen der Arten-Zusammensetzung innerhalb der Biozönosen. Durch die zusätzlichen Informationen aus 16S rDNA-Genbibliotheken kann die Auswertung der Ergebnisse einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung oder von Fingerprint-Techniken noch deutlich erhöht werden.

3.2 Die erhöhte biologische Phosphat-Elimination in der Abwasserbehandlung

3.2.1 Biologische Grundlagen

In konventionellen kommunalen Kläranlagen ohne verfahrenstechnische Maßnahmen zur erhöhten biologischen Phosphor-Elimination (**Enhanced Biological Phosphorus Removal; EBPR**) werden ca. 20-30 % des Phosphors durch einen Einbau in die Biomasse mit dem Überschussschlamm aus dem Abwasser entfernt (SCHAAK et al., 1985; MUDRAK UND KUNST, 1988). Der Phosphorgehalt der Belebtschlämme konventioneller Anlagen beträgt, bezogen auf die Trockenmasse, ca. 1-2% (SCHLEGEL, 1997). Demgegenüber besitzen Belebtschlämme aus Anlagen mit einer EBPR wesentlich höhere Phosphorkonzentrationen von 4% bis 15% (CROCETTI et al., 2000). Da dieser Anteil an Phosphor deutlich über dem natürlichen Phosphorgehalt einer Bakterienzelle (3% der TS; LURIA, 1960) liegt, geht man in diesem Zusammenhang von einer erhöhten biologischen Phosphoraufnahme aus. In diesen Anlagen werden über 90% des Phosphors aus dem Abwasser entfernt.

Die ersten Beobachtungen zur erhöhten Phosphoraufnahme bei Bakterien stammen aus den 50er-Jahren. Induziert durch eine unausgewogene Nährstoffzusammensetzung des Mediums (SMITH et al., 1954 u.v.a.) wird überschüssiges Phosphat in Form von Granula in den Bakterien als Polyphosphat gespeichert (KULAEV & VAGABOV, 1983). Der Phosphorgehalt der Zelle kann so auf über 10%, bezogen auf die Trockenmasse, steigen (DEINEMA et al., 1980). Bei Hefen sind sogar bis zu 20% möglich (LISS UND LANGEN, 1960). Die Polyphosphat-Granula enthalten neben Phosphor Proteine, Lipide, RNA und verschiedene Metallionen, wie z.B. Magnesium, Calcium und Eisen (KULAEV, 1979; BUCHAN et al., 1983; HEYMANN et al., 1989; RÖSKE et al., 1989).

Für diese erhöhte Phosphataufnahme werden in der Literatur zwei Mechanismen beschrieben (HAROLD, 1966). Zum einen eine durch Phosphormangel induzierte Speicherung, die als Überkompensation („overplus accumulation“) bezeichnet wird (LISS UND LANGEN, 1962). Dieses in Form von Polyphosphatgranula gespeicherte Phosphat wird jedoch während des Zellwachstums wieder abgebaut (SCHÖN UND STREICHAN, 1987). Zum anderen wird eine erhöhte Phosphataufnahme durch eine Akkumulation aufgrund von Stressbedingungen, die als „luxury uptake“ bezeichnet wird, erklärt. Beiden Mechanismen liegt zugrunde, dass die erhöhte Phosphoraufnahme nicht zum normalen Metabolismus der Mikroorganismen gehört, sondern eine Antwort auf veränderte Umweltbedingungen darstellt.

Eine erhöhte Phosphataufnahme von Belebtschlämmen wurde erstmalig unabhängig voneinander von SRINATH et al. (1959) und ALARKON (1961) beschrieben. Beide Autoren konnten in Batch-Versuchen für Belebtschlämme, die eine anaerobe Phase durchlaufen hatten, eine erhöhte Phosphataufnahme in der belüfteten Phase nachweisen. Als Ursache wurde zuerst eine chemische Fällung in Form von Calcium-Phosphaten postuliert.

Der Nachweis über die Beteiligung des Zellstoffwechsels an der Phosphatelimination in Belebtschlammanlagen konnte durch eine Hemmung der Phosphataufnahme durch die Zugabe von 2,4-Dinitrophenol, einem Entkoppler des Elektronentransports und der oxidativen Phosphorylierung, gezeigt werden (LEVIN & SHAPIRO, 1965). Die biologische Natur der beobachteten Phosphatrücklösung und –Aufnahme wurde von LEVIN & SHAPIRO (1965), FUHS & CHEN (1975) u.a. in weitergehenden Untersuchungen mit Belebtschlämmen bestätigt.

Da im kommunalen Abwasser im Regelfall kein Defizit an Phosphor auftritt, wurde als Mechanismus für die erhöhte Phosphoraufnahme das „luxury uptake“ der Bakterien diskutiert. Nach Ansicht anderer Autoren, wie z.B. VAN LOOSDRECHT (1997) und VAN GROENESTIJN et al. (1989), gehört bei speziellen Bakterien, den Bio-P-Bakterien, die erhöhte Phosphoraufnahme als Energiespeicher zum normalen Metabolismus, so dass weder die Überkompensation noch das „luxury uptake“ der entscheidende Mechanismus ist.

Aber auch die Beteiligung einer chemischen Bindung des Phosphats durch Metallionen, wie z.B. Magnesium und Calcium, wurde durch viele Autoren (ARVIN & KRISTENSEN, 1985; MIYA et al., 1987; UHLMANN et al., 1990; RÖSKE et al., 1993) nachgewiesen.

In früheren Studien zur mikrobiellen Zusammensetzung phosphatspeichernder Belebtschlämme wurde mittels klassischer Methoden, d.h. kulturabhängiger Verfahren, eine starke Dominanz der Gattung *Acinetobacter* nachgewiesen (FUHS & CHEN, 1975). In diesen Untersuchungen wurden für *Acinetobacter* prozentuale Anteile von über 50% an der Mikroflora der Belebtschlämme gefunden (BUCHAN, 1983; LÖTTER & MURPHY, 1985).

Zudem konnte für eine Vielzahl weiterer Belebtschlammissolate eine Phosphatspeicherung nachgewiesen werden. So wurden eine Reihe weiterer γ -Proteobakterien (wie z.B. *Pseudomonas spec.*, *Klebsiella spec.*, *Moraxella spec.* und *Enterobacter spec.*) und GRAM-positiver Bakterien (wie z.B. *Arthrobacter spec.* und *Micrococcus spec.*) isoliert, für die eine deutliche Phosphatspeicherung nachgewiesen werden konnte (HAROLD et al., 1965; SURESH et al., 1985; LÖTTER & MURPHY, 1985; NAKAMURA et al., 1991; HELMER 1994; SIDAT et al., 1999). Auch für fadenförmige Bakterien, wie z.B. *Microthrix spec.* und *Nocardia spec.* konnte eine Einlagerung von Polyphosphatgranula gezeigt werden (EIKELBOOM & VAN BUIJSEN, 1981).

Aufgrund der Dominanz der Gattung *Acinetobacter* in Belebtschlämmen von Anlagen mit EBPR wurden viele Studien zum Metabolismus der erhöhten Phosphoraufnahme und den daran beteiligten Enzymsystemen und Speicherstoffen durchgeführt (FUHS & CHEN, 1975; DEINEMA et al., 1980; WENTZEL et al., 1986; BUCHAN, 1983; LÖTTER und MURPHY, 1985; REES et al., 1993). In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass sich die verschiedenen Arten der Gattung *Acinetobacter* hinsichtlich ihrer Substratverwertung und der Polyphosphatspeicherung unterscheiden.

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen stellen die Grundlage fast aller heutigen biochemischen Modelle der erhöhten biologischen Phosphatelimination dar. Speziell seien hier das Comeau/Wentzel-Modell (COMEAU et al., 1986; WENTZEL et al., 1986) und das Mino-Modell (MINO et al., 1984; ARUN et al., 1988) zu nennen. Ein Überblick über die Unterschiede und Entwicklung der verschiedenen Modelle ist KUNST (1991) zu entnehmen.

Im Folgenden soll eine vereinfachte Darstellung (Abbildung 3.1) gegeben werden, die den unterschiedlichen Modellen als Grundlage dient. Der Prozess der EBPR ist charakterisiert durch den Wechsel zwischen anaeroben und aeroben Phasen und der Zugabe von Abwasser in der anaeroben Phase (BARNHARD, 1975).

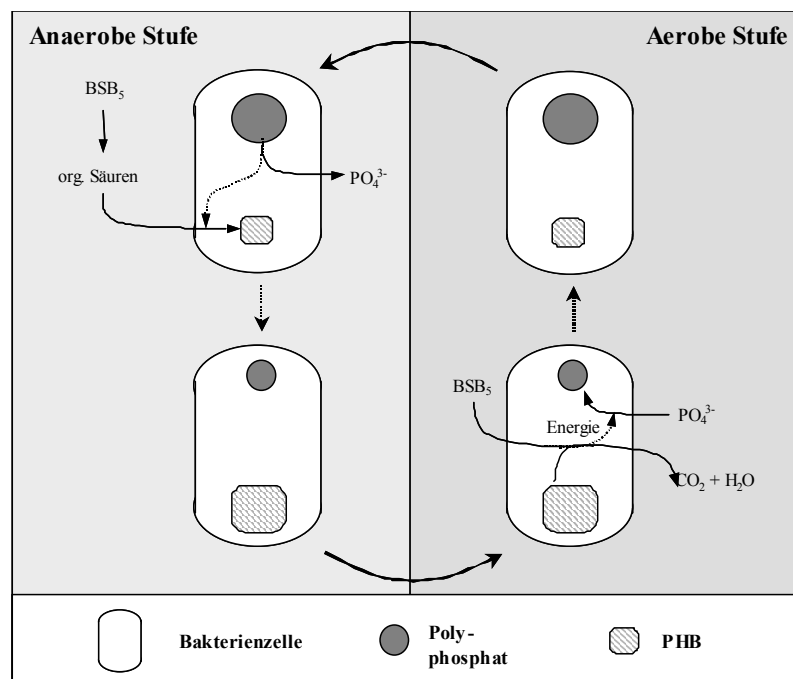


Abbildung 3.1: Vereinfachte Darstellung der bei der erhöhten biologischen Phosphorelimination maßgebenden Stoffwechselwege

In der anaeroben Stufe vergären fakultativ anaerobe Bakterien leicht abbaubare organische Verbindungen zu kurzkettigen Fettsäuren, vor allem zu Acetat (BRODISCH, 1985). Für die aeroben Organismen, zu denen die polyphosphatspeichernden Bakterien gehören, stellt die anaerobe Phase eine Stresssituation dar (MARAIS et al., 1983; COMEAU et al., 1986).

Aufgrund des gespeicherten Polyphosphates, das als Energiespeicher dient, sind sie jedoch in der Lage, die gebildeten Fettsäuren als Substrate zu nutzen. Unter Abbau des Polyphosphates werden aus dem Acetat Poly-β-hydroxyalkanoate (PHA), vor allem Poly-β-hydroxybuttersäure und Poly-β-valeriansäure (COMEAU, 1987), und/oder Glycogen synthetisiert und in den Zellen gespeichert (MINO, 2000). Durch die Rücklösung des Phosphates aus dem Polyphosphatspeicher kommt es zu einem Anstieg der Phosphatkonzentration im anaeroben Bereich.

In der aeroben Phase kommt es nach dem Verbrauch der organischen Substrate im Abwasser in den Zellen zu einem Absinken des NADH_2 -Spiegels, wodurch der Abbau der gespeicherten PHA induziert wird. Die PHA werden zu Acetyl-CoA abgebaut, welches von der Zelle sowohl für den Anabolismus als auch für den Katabolismus, d.h. den Abbau über den Tricarbonsäure-Cyclus, genutzt wird. Aus dem Abbau des endogenen PHA-Speichers gewinnen die Mikroorganismen zudem Energie in Form von ATP, das die Speicherung von Phosphat in Form von Polyphosphat induziert. Durch dessen intrazelluläre Speicherung kommt es zu einer Abnahme der Phosphatkonzentration im umgebenden Medium.

3.2.2 Polyphosphatakkumulierende Organismen (PAO) im Belebtschlamm

Die erste morphologische Charakterisierung von polyphosphatspeichernden Bakterien stammt von FUHS & CHEN (1975) und beruht auf einer mikroskopischen Untersuchung von Belebtschlämmen mit einer erhöhten Phosphatspeicherung. Demnach handelte es sich um GRAM-negative, nicht bewegliche Stäbchen oder Kokken, die in Clustern auftreten.

Die erste Gattung, der aufgrund einer hohen Abundanz in Belebtschlämmen mit EBPR eine bedeutende Rolle zugewiesen wurde, war die Gattung *Acinetobacter* (FUHS & CHEN, 1975; DEINEMA et al., 1985; LÖTTER & MURPHY, 1985; WENTZEL et al., 1986; BEACHAM et al., 1992). In späteren Untersuchungen mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden konnte diese Dominanz jedoch nicht bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.2.2.2).

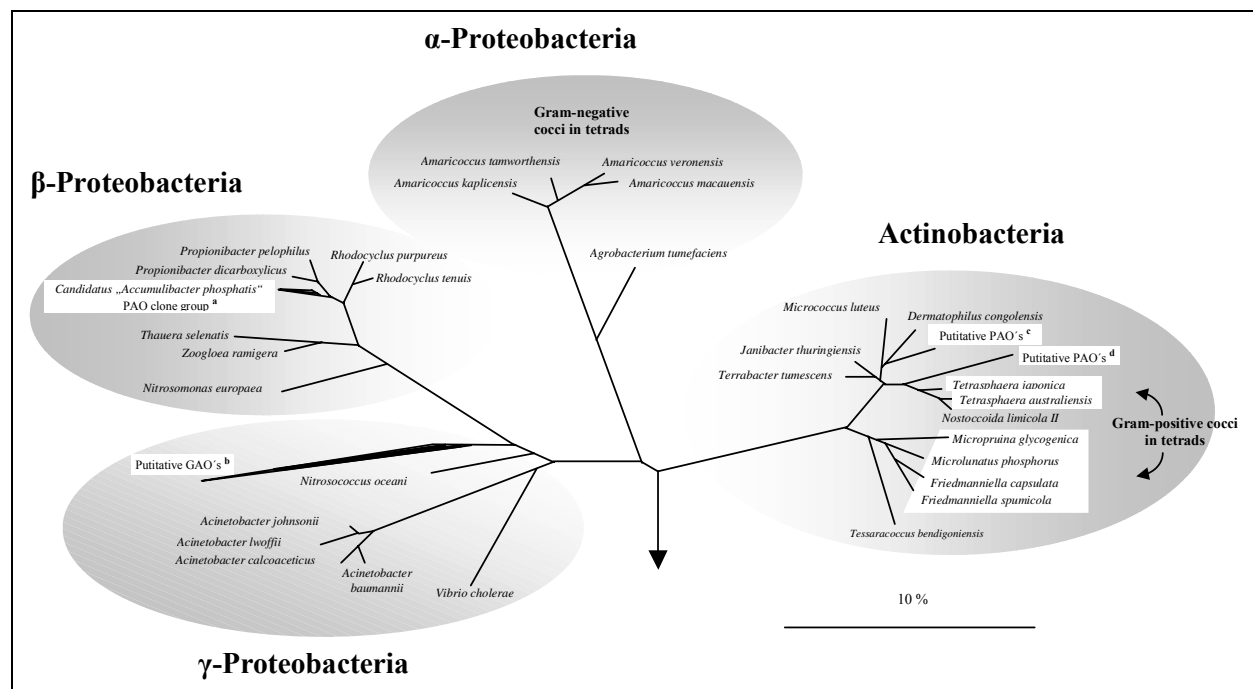


Abbildung 3.2: Phylogenetische Einordnung einiger Bakterien, die direkt mit der EBPR in Belebtschlämmen in Verbindung gebracht werden (übernommen aus WAGNER et al., 2002). Hinter den potentiellen PAOs a-d stehen 16S rDNA-Sequenzen aus Veröffentlichungen folgender Autoren: a) DABERT et al., 2001 ; CROCETTI et al., 2000 ; HESSELMANN et al., 1999; b) NIELSEN et al., 1999 ; LIU et al., 2000 ; DABERT et al., 2001; c) LIU et al., 2000; d) CHRISTENSSON et al., 1998 ; LIU et al., 2001.

Des Weiteren konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl GRAM-negative als auch GRAM-positive Bakterien ähnlicher Morphologie an der erhöhten Phosphataufnahme beteiligt sind (WAGNER et al., 1994; LIU, 1995). Zu den GRAM-negativen Mikroorganismen gehören u.a. 'Candidatus Accumulibacter phosphatis' (β -Proteobakterien), *Lampropedia* (γ -Proteobakterien) und γ -Proteobakterien assoziiert zu *Haliscomenobacter hydrossis*, zu den GRAM-positiven *Micrococcus phosphorus*, *Micropruina glycogenica* und *Tetrasphaera spec.* (Abbildung 3.2).

3.2.2.1 *Rhodocyclus*-Gruppe (β -Proteobakterien)

Die ersten Hinweise über eine Beteiligung von Vertretern der *Rhodocyclus*-Gruppe an der biologischen Phosphorelimination stammen von BOND et al. (1995). In ihren Untersuchungen verglichen sie die mikrobielle Zusammensetzung von Belebtschlämmen zweier SBR, mit und ohne EBPR, auf der Grundlage von 16S rRNA-Genbibliotheken.

Die größten Unterschiede zwischen den untersuchten Genbibliotheken fanden sie innerhalb der *Rhodocyclus*-Gruppe. Die Genbibliothek des SBRs mit einer erhöhten biologischen Phosphatelimination enthielt deutlich mehr Sequenzen dieser Gruppe als die ohne EBR.

Zur *Rhodocyclus*-Gruppe, die zur β_2 -Untergruppe der Proteobakterien (WOESE et al., 1985) geordnet wird, zählen Vertreter der Gattung *Rhodocyclus* sowie Vertreter der Gattungen *Azoarcus* und *Zoogloea* (LARSEN et al., 1993).

Durch die Kombination von FISH und DAPI wurden in weitergehenden Untersuchungen die Ergebnisse durch verschiedene Autoren bestätigt. CROCETTI et al. (2000) und HESSELMANN et al. (1999) konnten in SBR, die mit künstlichem, Acetat-haltigem Abwasser betrieben wurden, einen Anteil der β_2 -Untergruppe der Proteobakterien von $\geq 80\%$ nachweisen. Einen Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe von ca. 40% bestimmten LIU et al. (2001) in einer kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage, die ebenfalls mit künstlichem Abwasser betrieben wurde.

In diesen Untersuchungen konnten die Autoren mit spezifischen Oligonukleotidsonden für Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe Bakterien ähnlicher Morphologie hybridisieren, die sowohl aerob Polyphosphat als auch anaerob PHB speicherten. Es waren Kurzstäbchen mit einer Länge von ca. 2,1 μm und einer Breite von ca. 1,2 μm (HESSELMANN et al., 1999) bzw. kleine kokkoide Bakterien (LIU et al., 2001).

Auch in kommunalen Anlagen konnten Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe nachgewiesen werden. Jedoch war der Anteil dieser Gruppe im Belebtschlamm der untersuchten Kläranlagen mit 6% und 20% im Gegensatz zu den Untersuchungen von CROCETTI et al. (2000) und HESSELMANN et al. (1999) deutlich kleiner (ZILLES et al., 2002).

ZILLES et al. (2002) zeigten zudem, dass nicht alle Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe Polyphosphat-Granula besaßen und diese Gruppe z.T. nur einen geringen Anteil an der Gruppe der polyphosphatspeichernden Bakterien ausmachte. Ihr Anteil lag zwischen 26% und 73%.

In Untersuchungen von LEE et al. (2002), in denen der Zulauf (kommunales Abwasser) von zwei Versuchsanlagen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acetat und Glukose aufgestockt wurde, konnte der Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe, aber auch der γ -Proteobakterien an der mikrobiellen Biozönose signifikant erhöht werden. Der Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe lag zwischen 5% und 18% in der A/O-Anlage und zwischen 4% und 28% in der Phoredox-Anlage. Die höchste Korrelation zwischen dem P-Gehalt des Schlammes und einzelnen Bakteriengruppen fanden die Autoren für die *Rhodocyclus*-Gruppe und die GRAM-positiven Bakterien.

Dieses Ergebnis konnte in Untersuchungen mit radiomarkiertem 32 Phosphat bestätigt werden. Hierbei wurde ein Einbau des radiomarkierten Phosphats vor allem für Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe und der GRAM-positiven Bakterien nachgewiesen (LEE et al., 2002). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass nicht alle Organismen, die mit der *Rhodocyclus*-spezifischen Sonde hybridisierten, radiomarkiertes Phosphat inkorporierten.

3.2.2.2 *Acinetobacter spec.* (γ -Proteobakterien)

Wie im Kapitel 3.2.1 dargestellt, gehörten die ersten Mikroorganismen, die aufgrund ihrer Dominanz in Belebtschlämmen mit einer erhöhten Phosphoraufnahme mit der EBPR in Verbindung gebracht wurden, zur Gattung *Acinetobacter* (FUHS & CHEN, 1975; BUCHAN, 1983; LÖTTER, 1985; HELMER, 1994).

Die Vertreter der Gattung *Acinetobacter* sind obligat aerob, GRAM-negativ und unbeweglich. Sie besitzen alle Enzyme des Tricarbonsäure-Cyclus und des Glyoxylat-Zyklus, sind Katalase positiv und Oxidase negativ (JUNI, 1978). Die Speicherung von Polyphosphat und PHA wurde von mehreren Autoren bestätigt (FUHS & CHEN, 1975; LAWSON & TONHAZY, 1980). Jedoch zeigte keines der bisherigen Isolate die für die biologische Phosphatelimination postulierten physiologischen Eigenschaften (MINO et al., 1998). Dies wären eine anaerobe PHB-Synthese in Verbindung mit einer Acetataufnahme und gleichzeitiger Phosphatfreisetzung.

In weitergehenden Untersuchungen mit immunologischen, chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden beschrieben mehrere Autoren unabhängig voneinander, dass der Anteil der Gattung *Acinetobacter* in den Belebtschlämmen mit einer erhöhten Phosphatspeicherung meist deutlich unter 10% liegt (CLOETE & STEYN, 1988; HIRAISHI et al., 1990; AULING et al., 1991; WAGNER et al., 1994). Zudem konnten WAGNER et al. (1994) durch den Einsatz der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zeigen, dass die Dominanz der Gattung *Acinetobacter* durch das kultivierungsabhängige Nachweisverfahren auf Acetat-haltigem Medium verursacht wurde.

3.2.2.3 *Lampropedia spec.* (γ -Proteobakterien)

Ein weiterer Organismus aus der γ -Gruppe der Proteobakterien, der direkt mit der EBPR in Beziehung gebracht wird, ist *Lampropedia spec.*. Dieses Bakterium wurde aus Belebtschlamm eines SBR isoliert, der zur Reinigung von Molkereiabwasser und Abwasser einer Schweinezuchtanlage eingesetzt wurde (STANTE et al., 1997).

Das kokkoide Bakterium besitzt in Reinkulturen ein charakteristisches Koloniewachstum in mattenförmigen Zellaggregaten an der Oberfläche des Mediums. Für die GRAM-negativen, strikt aeroben Bakterien konnte in Reinkultur eine Speicherung von Polyphosphat sowie eine anaerobe PHB-Speicherung bestätigt werden. Quantitative Angaben über das Vorkommen dieser Gattung in Belebtschlämmen liegen derzeit nicht vor.

3.2.2.4 Unbekannte Gruppe innerhalb der γ -Proteobakterien

NIELSEN et al. (1999) konnten durch die Kombination von DGGE und FISH eine neue bisher unbekannte Gruppe der γ -Proteobakterien im Belebtschlamm eines SBR nachweisen. Dieser SBR wurde mit künstlichem Abwasser mit Acetat als Hauptkohlenstoffquelle betrieben und zeigte nur eine unvollständige EBPR.

Vier Sequenzen, welche die Autoren bei der Analyse der dominanten DGGE-Banden erhielten, gehörten zu den γ -Proteobakterien und bildeten eine distinkte Gruppe zu bisher bekannten Sequenzen. Mit Oligonukleotidsonden, die anhand dieser Sequenzen konstruiert worden waren, identifizierten die Autoren *in situ* zwei unterschiedliche Bakteriengruppen mit ähnlicher Morphologie, d.h. große kokkoide Bakterien (3-4 μm), die einen Anteil von ca. 35% an der Belebtschlamm-biozönose besaßen. Für beide Gruppen konnten die Autoren eine Polyphosphat- und PHB-Speicherung nachweisen.

3.2.2.5 *Tetrasphaera spec.* und *Microlunatus phosphorus* (GRAM-positive Bakterien)

Aus Belebtschlämmen mit einer erhöhten Phosphatspeicherung wurden auch eine Reihe von polyphosphatspeichernden Bakterien isoliert, die zu den GRAM-positiven Bakterien gehören (LIU, 1995; NAKAMURA et al., 1995; MASZENAN et al., 1999 und 2000).

Microlunatus phosphorus und Vertreter der Gattung *Tetrasphaera* besitzen eine kokkoide bis kurzstäbchenförmige Zellform mit einem Durchmesser zwischen 0,5 und 1 μm . Sie treten in unregelmäßigen bis tetraedrischen Clustern auf (LIU, 1995; NAKAMURA et al., 1995; MASZENAN et al., 2000) auf.

Für diese Gruppe konnte anhand einiger Isolate und mittels Einsatz von ^{32}P markiertem Phosphat eine Polyphosphatspeicherung (LEE et al., 2002) bestätigt werden. Angaben über eine anaerobe PHB-Speicherung fehlen aber bisher.

Durch den Einsatz von spezifischen Oligonukleotidsonden konnten LIU et al. (2001) in einer kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage, die mit künstlichem Abwasser betrieben wurde, einen Anteil an GRAM-positiven Bakterien von ca. 18% nachweisen. 93% dieser Bakterien waren nahe verwandt mit *Tetrasphaera japonica*. Für diese Bakterien, die eine stäbchenförmige Morphologie besaßen, konnte eine Polyphosphatspeicherung, jedoch keine PHB-Speicherung, nachgewiesen werden.

NAKAMURA et al. (1995) konnten mittels FISH *Microcylindropsira phosphorus*, einen kokkoiden Vertreter der GRAM-positiven Bakterien, im Belebtschlamm nachweisen. Mit einem Anteil von ca. 3% war diese Art für die Belebtschlammbiozönose von untergeordneter Bedeutung. Sie stellte jedoch mit ca. 30% einen wichtigen Anteil an der Gruppe der polyphosphatspeichernden Bakterien (ca. 9%) dar.

3.2.2.6 Fadenförmige GRAM-positive Bakterien

Hierzu gehören u.a. einige mit *Nostocoida limicola* verwandte Organismen sowie *Microthrix parvicella*. Anhand von Isolaten und Untersuchungen an Belebtschlämmen konnte für diese Organismen ebenfalls eine Einlagerung von Polyphosphat bestätigt werden (ANDREASEN & NIELSEN, 1998; BLACKALL et al., 2000). Diese Polyphosphatspeicherung scheint jedoch nicht in Beziehung zu den Sauerstoffverhältnissen zu stehen und ist damit wahrscheinlich nicht für die EBPR verantwortlich (LEE et al., 1999).

3.3 Nitrifikation in der Abwasserreinigung

Aufgrund der in Deutschland gültigen gesetzlichen Grenzwerte von maximal 10 mg Gesamt-Stickstoff pro Liter ab einer Ausbaugröße $>300 \text{ kg BSB}_5 \text{ (roh) d}^{-1}$ kommt der biologischen Stickstoffelimination eine steigende Bedeutung in der kommunalen Abwasserbehandlung zu. Im folgenden soll näher auf den ersten Schritt der Stickstoffelimination, der Nitrifikation, und den daran beteiligten Mikroorganismen eingegangen werden.

Im Zulauf von kommunalen Kläranlagen liegt Stickstoff in Form von reduzierten Verbindungen, vor allem als Ammonium, vor. Ein Teil des Ammoniums wird direkt assimiliert und in die Biomasse eingebaut. Ein weiterer Teil wird bei entsprechender Verfahrensweise zu Nitrat umgesetzt. Für diese Umsetzung sind zwei physiologische Gruppen von aeroben autotrophen Bakterien verantwortlich.

Den ersten Schritt, die Umsetzung von Ammonium zu Nitrit, katalysieren die Ammonium oxidierenden Bakterien. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind die Ammonium-Monooxygenase (amoA), deren Gen zum molekularen Nachweis dieser physiologischen Gruppe eingesetzt wird (ROTHAUWE et al., 1997), und die Hydroxylaminoxidoreduktase.

Phylogenetisch ordnen sich die Ammonium oxidierenden Bakterien in zwei phylogenetische Gruppen. Die meisten der bisher beschriebenen Spezies sind β -Proteobakterien und gehören zu den Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* oder *Nitrosovibrio*. Ebenfalls zu den β -Proteobakterien gehört *Nitrosococcus mobilis*, die dem *Nitrosomonas*-Cluster zugeordnet wird. Dagegen zählen die *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus* zu den γ -Proteobakterien (POMMERENING-RÖSER et al., 1996; HEAD et al., 1998; PURKHOLD et al., 2000).

Das gebildete Nitrit wird im zweiten Schritt durch die nitritoxidierenden Bakterien zu Nitrat umgesetzt. Diese physiologische Gruppe ist im Vergleich zu den Ammonium oxidierenden Bakterien phylogenetisch sehr viel heterogener. Die Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrococcus* und *Nitrospina* gehören zu unterschiedlichen Unterklassen der Proteobakterien; *Nitrobacter* zur α -subclass, *Nitrococcus* zur γ -subclass und *Nitrospina* zur δ -subclass. Die Gattung *Nitrospira* bildet dagegen einen eigenen Stamm innerhalb der *Bacteria* (BOCK & KOOPS, 1992).

Beide Organismengruppen, d.h. sowohl die ammonium- als auch die nitritoxidierenden Bakterien, treten im Belebtschlamm in charakteristischen kugelförmigen Zellverbunden auf (WAGNER et al., 1996, BURRELL et al., 2001). Diese besitzen einen Durchmesser von 20 μm und größer (SCHRAMM et al., 1998).

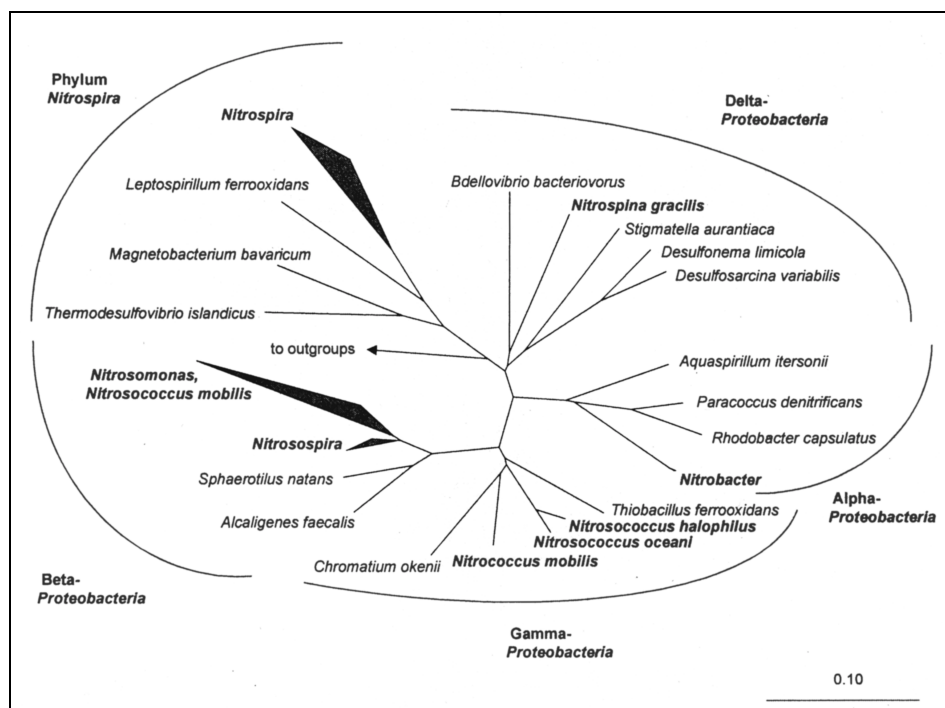


Abbildung 3.3: Phylogenetische Zuordnung der Ammonium- und Nitrit-oxidierenden Bakterien zu den Proteobakterien und dem Phylum *Nitrospira*. Die Gattungen *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* wurden der Gattung *Nitrospira* zugeordnet. (aus DAIMS, 2001)

Die theoretischen Grundlagen der oxidativen Stickstoffumsetzungen und der daran beteiligten Organismen basieren, vergleichbar zur biologischen Phosphorelimination, auf den Ergebnissen von klassischen, kultivierungs-abhängigen Untersuchungen. Als Modellorganismen, deren Umsatzraten in die Modelle integriert wurden, dienten die Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* (z.B. HENZE et al., 1997).

Für verschiedene Belebtschlammssysteme konnte durch den Einsatz von Antikörpern, der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und spezifischen PCR-Analysen eine Beteiligung der Gattung *Nitrosomonas* an der Ammoniumoxidation bestätigt werden (VAN DER WAARDE et al., 1998; JURETSCHKO et al., 1998; PURKHOLD et al., 2000; GIESEKE et al., 2001; MOBARRY et al., 1996; ROTTHAUWE et al., 1997; NODA et al., 2000, BARTOSCH et al., 1999). Dabei traten neben *N. eutropha* und *N. europaea* auch *N. oligotropha* und *Nitrosococcus mobilis* als Ammonium oxidierende Organismen auf. In einem nitrifizierenden SBR im Labormaßstab wurde dagegen durch SCHRAMM et al. (1998) eine Dominanz von *Nitrospira* nachgewiesen.

Eine Dominanz der Gattung *Nitrobacter* konnte mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Belebtschlammssystemen nicht bestätigt werden. Als dominierender Nitritoxidierer trat hier die Gattung *Nitrospira* auf (SCHRAMM et al., 1998 und 1999; JURETSCHKO et al., 1998; WAGNER et al., 1998).

BARTOSCH et al. (1999) konnten in ihren Untersuchungen durch eine Kombination der FISH mit einer *in situ* Messung der Nitritkonzentration mittels Mikroelektroden Hinweise auf eine Abhängigkeit der Dominanz bestimmter Nitritoxidierer von der Nitrit-Konzentration finden. So dominierte die Gattung *Nitrospira* in Habitaten mit niedrigen, die Gattung *Nitrobacter* bei höheren Nitritkonzentrationen ($> 0,5$ mM).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Aufbau und Betrieb der Versuchsanlagen

4.1.1 Verfahrenstechnische Parameter

Im Rahmen der Arbeit wurden die Belebtschlammbiozönosen von zwei Versuchsanlagen unterschiedlicher Betriebsweise über einen Zeitraum von 8 Monaten untersucht und miteinander verglichen. Um möglichst praxisnahe Bedingungen zu schaffen, wurden die Versuchsanlagen mit dem Abwasser einer kommunalen Kläranlage beschickt.

Da eine im Untersuchungszeitraum eingeführte Satzungsänderung des zuständigen Klärverbandes dazu führte, dass sich der Anteil der angelieferten Fäkalschlämme (aus Dreikammerklärgruben) auf bis zu 50% des Zulaufes erhöhte, wurde das für die Versuche benötigte Abwasser täglich vor der Zugabe der Fäkalien aus dem Sandfang entnommen und in einem Tank gespeichert.

In den Anaerobbecken und im anoxischem Becken der Versuchsanlagen wurde ein Absetzen des Belebtschlammes durch installierte Rührer verhindert. In den Belebungsbecken erfolgte der Eintrag der benötigten Turbulenz durch die Belüftung. In den Kaskadenbecken der Phoredox-Anlage wurden zusätzlich zur Belüftung Rührer eingebaut, um ein Absetzen des Belebtschlammes in den Ecken zu verhindern.

Die Belüftung erfolgte mit einer Linearpumpe (TYP LP-100A, ASF Thomas, Puchheim) über gelochte PVC-Rohre, die am Beckenboden fixiert wurden. Die Belüftungsintensität wurde so eingestellt, dass die Sauerstoffkonzentration auch in der letzten Einheit des Kaskadenbeckens über $2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ lag.

4.1.2 Aufbau der A/O- und der AS-Anlage

Die A/O-Anlage wurde im ersten Versuchsabschnitt als einfache Anaerob/Aerob-Anlage ohne Stickstoffelimination betrieben (Abbildung 4.1). Diese Verfahrensweise wurde gewählt, um die erhöhte biologische P-Elimination ohne den Einfluss der parallelen Stickstoffelimination durch Nitrifikation und Denitrifikation untersuchen zu können.

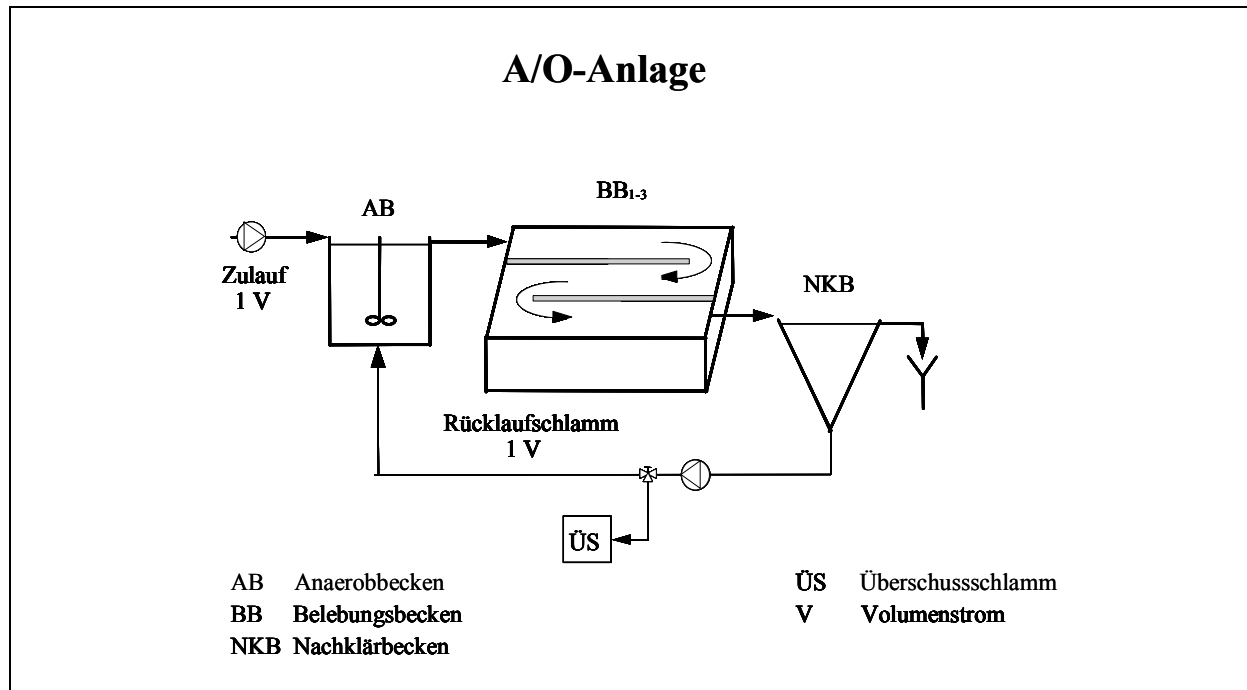


Abbildung 4.1: A/O-Anlage

In der zweiten Versuchsphase wurde diese Anlage als Belebungsanlage ohne Anaerobbecken (**AS-Anlage**) betrieben. Hierbei sollten die Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakterienbiozönose infolge Fehlens einer anaeroben Stufe zur Phosphatfreisetzung untersucht werden.

Tabelle 4.1: Beckenvolumina der Anlagen

	Zulauf [l d ⁻¹]	AB [l]	BB [l]	NKB [l]
A/O-Anlage	144	10	34	30
AS-Anlage	144	--	34	30

4.1.3 Aufbau der Phoredox-Anlage

Diese Anlage wurde nach dem Phoredox-Verfahren, einem modifizierten Bardenpho-Verfahren (BARNARD, 1976), als schwachbelastete Anlage mit kombinierter Phosphat- und Stickstoffelimination betrieben. Die Anlage besaß eine vorgeschaltete Denitrifikation, aber kein separates Becken zur Denitrifikation des Rücklaufschlammes (Abbildung 4.2).

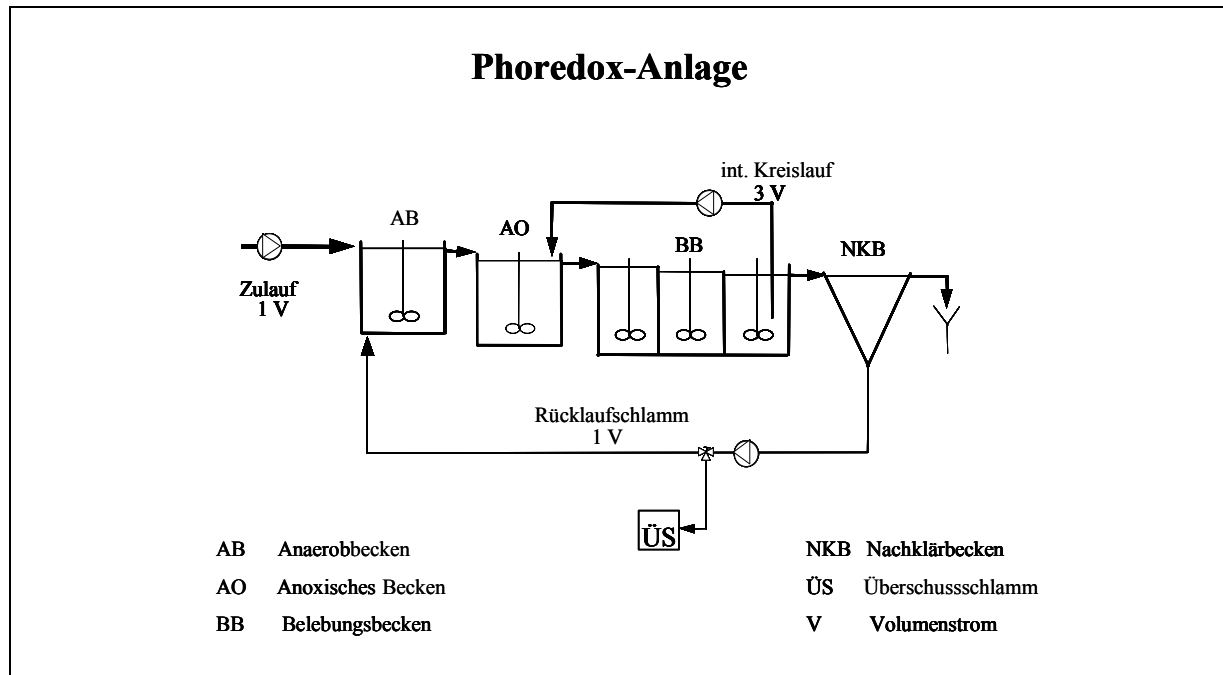


Abbildung 4.2: Phoredox-Anlage

Tabelle 4.2: Beckenvolumina im Untersuchungszeitraum

	Zulauf [l d ⁻¹]	AB [l]	AO [l]	BB [l]	NKB [l]
Phoredox-Anlage	146	15	25	111 (33/39/39)	30

4.2 Untersuchte Kläranlagen

Für eine Bewertung der molekularbiologischen Ergebnisse wurden drei kommunale Kläranlagen als Vergleichsobjekte in die Untersuchungen aufgenommen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Belastung und des unterschiedlichen Abwassers stellen diese in Hinblick auf die Bakterienbiozönosen sehr verschiedene Habitate dar.

4.2.1 Kläranlage Dresden-Kaditz

Die Kläranlage Dresden-Kaditz ist für die Reinigung des Abwassers der Stadt Dresden und umliegender Gemeinden verantwortlich. Das Abwasser gelangte in einer Mischkanalisation mit Anteilen von sanierter Trennkanalisation in die Kläranlage. Während der Untersuchungen wurde sie als Hochlastanlage betrieben. Bis zum Jahre 2004 soll die Erweiterung der biologischen Stufe auf 650.000 EWG abgeschlossen werden.

Die Kläranlage Kaditz war zur Zeit der Untersuchungen mit einer Schlammbelastung von ca. $2,2 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}^{-1} \text{ TS} \cdot \text{d}^{-1}$ und einem Schlammalter von 2 Tagen eine hochbelastete Anlage. Das im Abwasser enthaltene Phosphat wurde mit Hilfe von Fällungsmittel (FeCl_3) aus dem Abwasser entfernt, eine biologische Stickstoffelimination war nicht vorhanden.

4.2.2 Kläranlage Bad Liebenwerda

Die Kläranlage der Stadt Bad Liebenwerda (ca. 11.000 Einwohner) liegt an der Schwarzen Elster, ca. 70 km nördlich von Dresden, und wurde 1993 in Betrieb genommen. Sie hat eine Ausbaugröße von 20.000 EWG und besitzt einen belüfteten Sandfang, ein Anaerobbecken sowie zwei Belebungs- und Nachklärbecken.

Aufgrund der geringen Auslastung (Anschlussgrad ca. 30%) und des damit verbundenen hohen Schlammalters war im Untersuchungszeitraum nur ein Belebungs- und ein Nachklärbecken, d.h. kein Anaerobbecken, in Betrieb.

Die Stickstoff- und Phosphorelimination erfolgte in den Sommermonaten durch eine intermittierende Belüftung. Nach Erreichen einer Sauerstoffkonzentration von $3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ wurde die Belüftung abgestellt und es folgte eine Denitrifikationsphase mit anschließender Anaerobphase zur Phosphatrücklösung von 30 min. Anschließend wurde wieder belüftet.

Das Abwasser wurde in einer Mischkanalisation der Kläranlage zugeführt und war kaum von Industrieabwasser beeinflusst. Auf der Kläranlage wurden zum Abwasser zusätzlich Fäkalien aus Dreikammerklärgruben (bis zu $100 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$) dosiert. Bei einem Schlammalter von ca. 80 Tagen betrug die Schlammbelastung $0,017 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$ (vgl. Tabelle 4.3).

4.2.3 Kläranlage Elsterwerda

Die Stadt Elsterwerda (ca. 12.000 Einwohner) liegt, wie Bad Liebenwerda, im südlichen Brandenburg. Die Kläranlage hatte im Untersuchungszeitraum eine Ausbaugröße von 80.000 EWG und war ebenfalls deutlich überdimensioniert.

Das Abwasser setzte sich aus ca. 80% Molkereiabwasser und 20% kommunalem Abwasser zusammen. Aufgrund des großen Anteiles an Molkereiabwasser besaß das Abwasser ein sehr niedriges CSB:BSB₅-Verhältnis (1,5:1) und ein N:P-Verhältnis von 3,5:1. Die Jahresdurchschnittstemperatur des Abwassers lag bei ca. 20°C.

Aufgrund der hohen Temperaturen war eine biologische Stickstoffelimination ganzjährig mit hohem Wirkungsgrad möglich. Die Stickstoffkonzentrationen im Ablauf lagen bei durchschnittlich $10 \text{ mg N}_{\text{ges.}} \text{ l}^{-1}$ und $1,2 \text{ mg NH}_4\text{-N l}^{-1}$. Phosphat wurde mit Ausnahme der Monate Juli bis August ohne Zudosierung eines Fällungsmittels (FeCl_3) auf biologischem Wege aus dem Abwasser entfernt.

Trotz des hohen BSB des Abwassers (1900 mg l^{-1}) wurden aufgrund der Größe dieser Kläranlage eine sehr niedrige Schlammbelastung ($0,044 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$) und ein sehr hohes Schlammalter von ca. 68 Tagen ermittelt (vgl. Tabelle 4.3).

4.3 Vergleich der untersuchten Anlagen

4.3.1 Gegenüberstellung der verfahrenstechnischen Parameter

In Tabelle 4.3 sind die wichtigsten verfahrenstechnischen Parameter der untersuchten Versuchs- und Kläranlagen zusammengestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Kläranlagen Bad Liebenwerda und Elsterwerda aufgrund des hohen Schlammalters und der geringen Schlammbelastung deutlich von den anderen Anlagen unterscheiden. Zudem wurde in diesen Anlagen die biologische Phosphor- und Stickstoffelimination mit einer chemischen Fällung kombiniert.

Die Phoredox-Anlage besaß ebenfalls eine biologische Stickstoff- und Phosphatelimination. Jedoch war diese Anlage durch eine deutlich höhere Schlammbelastung und ein niedrigeres Schlammalter gekennzeichnet. Die A/O-Anlage besaß eine erhöhte biologische Phosphorelimination aber keine biologische Stickstoffelimination durch Nitrifikation und Denitrifikation.

Tabelle 4.3: Verfahrenstechnische Parameter der untersuchten Anlagen

	Schlammalter	Schlamm- belastung	Biologische N-Elimination	Biologische P-Elimination
	[d]	[kg BSB ₅ kg ⁻¹ TS d ⁻¹]	[+/-]	[+/-] (F: Fällung)
Kläranlage Bad Liebenwerda	80	0,017	+	+ (F)
Kläranlage Elsterwerda	68	0,044	+	+ (F)
Phoredox-Anlage	18	0,18	+	+
A/O-Anlage	4,4	0,45	-	+
AS-Anlage	2,41	0,54	-	(+/-)
Kläranlage Kaditz	2	2,2	-	F

Die AS-Anlage wurde als hoch belastete Belebungsanlage ohne biologische Phosphor- und Stickstoffelimination ausgelegt. Aufgrund des großen Volumens des Nachklärbeckens kam es jedoch in diesem zu einer geringen Phosphatrücklösung. Die Schlammbelastung (ca. 0,54 kg BSB₅ kg⁻¹ TS d⁻¹) war mit der der A/O-Anlage vergleichbar. Das Schlammalter (ca. 2,4 Tagen) entsprach dem der Kläranlage Kaditz.

Die Kläranlage Kaditz war mit einer Schlammbelastung von $2,2 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}^{-1} \text{ TS d}^{-1}$ am höchsten belastet. Die Posphateliminierung erfolgte in dieser Anlage durch Zugabe von FeCl_3 , während Stickstoff nur mit dem Überschussschlamm aus dem Abwasser entfernt wurde.

4.3.2 Gegenüberstellung der Abwasserzusammensetzung

Das Abwasser der KA Elsterwerda ist mit einer BSB_5 -Konzentration von 1.900 mg l^{-1} am konzentriertesten (Tabelle 4.4). Aufgrund des hohen Anteils an Molkerei-Abwasser (bis zu 80%) ist aber das $\text{CSB}:\text{BSB}_5$ -Verhältnis (1,5:1) sehr klein (Tabelle 4.5). Dies bestätigt die sehr gute Abbaubarkeit des Molkerei-Abwassers. Das Abwasser besitzt zudem das niedrigste $\text{N}:\text{C}$ -Verhältnis der untersuchten Abwässer und eine für das Rohabwasser bemerkenswert hohe Nitrat-Konzentration (Tabelle 4.4). Diese hohen Nitrat-Konzentrationen sind durch die in der CIP-Reinigung (Cleaning In Place) verwendete Salpetersäure zu erklären.

Dagegen wird in der Kläranlage Bad Liebenwerda hauptsächlich kommunales Abwasser gereinigt. Dieses besitzt jedoch wegen der hohen Zudosierung von Fäkalschlämmen aus Dreikammerklärgruben (bis zu 50% des Zulaufes) mit $1.030 \text{ mg BSB}_5 \text{ l}^{-1}$ ebenfalls eine hohe organische Belastung. Trotz der hohen Ammoniumkonzentrationen (ca. 70 mg N l^{-1}) ist dieses Abwasser aufgrund der hohen BSB_5 -Konzentration durch ein niedriges $\text{N}:\text{C}$ -Verhältnis gekennzeichnet (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der Abwässer der untersuchten Kläranlagen

	BSB₅ [mg l ⁻¹]	CSB [mg l ⁻¹]	NH₄-N [mg l ⁻¹]	NO₃-N [mg l ⁻¹]	PO₄-P [mg l ⁻¹]
Kläranlage Elsterwerda	1900	2920	40	12	33
Kläranlage Bad Liebenwerda	1030	1740	70	3	20
Phoredox-Anlage	450	850	65	--	14
A/O-Anlage	470	830	64	--	11
AS-Anlage	410	660	61	--	12
Kläranlage Kaditz	210	440	32	--	7

Das Abwasser, mit dem die Versuchsanlagen betrieben worden waren, wurde morgens aus dem Sandfang entnommen, mit Leitungswasser verdünnt und in einem Vorratsbehälter zwischengelagert. Trotz der Aufstockung des CSBs durch Zugabe von Essigsäure, Saccharose und Stärke (39% : 39% : 22%, bezogen auf C) um 100 mg l^{-1} war die BSB_5 -Konzentration des Abwassers mit durchschnittlich $450 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ deutlich niedriger als die des Abwassers der KA Bad Liebenwerda (Tabelle 4.4). Das C:N:P-Massen-Verhältnis entsprach dem der KA Kaditz. Jedoch besaß das Abwasser der KA Kaditz mit durchschnittlich $210 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ die niedrigste BSB_5 -Konzentration der untersuchten Anlagen.

Tabelle 4.5: C:N:P-Massenverhältnisse der Abwässer der untersuchten Kläranlagen

	CSB:BSB₅	C (BSB₅) : N : P
KA Elsterwerda	1,5	100 : 3 : 2
KA Bad Liebenwerda	1,7	100 : 7 : 2
Phoredox-Anlage	1,9	100 : 14 : 3
A/O-Anlage	1,8	100 : 14 : 3
AS-Anlage	1,6	100 : 10 : 2
KA Kaditz	2,1	100 : 10 : 2

4.4 Routineanalytik

In Tabelle 4.6 sind die Untersuchungsmethoden, welche zur Routineüberwachung der Versuchsanlagen eingesetzt wurden, zusammengestellt. Die Proben zur Bestimmung der chemischen Parameter wurden über Papierfilter (Filtrak, Sorte 3 hw) filtriert.

Tabelle 4.6: Untersuchungsmethoden (Physikalische Parameter)

1. Physikalische Parameter		
Parameter	Einheit	Untersuchungsmethode
Glührückstand	[mg l ⁻¹]	DEV, DIN 38414, T10
pH-Wert		DEV, DIN 38404, C5
Redoxpotential	[mV]	DEV, DIN 38404, T6
Sauerstoff	[mg l ⁻¹]	DEV, DIN-EN 25814
Schlammvolumen	[ml l ⁻¹]	DEV, DIN 38414, T10
Temperatur	[°C]	WTW Oxi 196; EO 196-1,5
Trockensubstanz	[g TS l ⁻¹]	DEV, DIN 38409, T1
2. Chemische Parameter		
Parameter	Einheit	Untersuchungsmethode
ortho-Phosphat	[mg l ⁻¹]	AMWU (1986), T2
Gesamt-Phosphor	[mg l ⁻¹]	Aufschluss mit Salpetersäure, Perchlorsäure, Schwefelsäure (unveröff. Labormethode)
Ammonium-Stickstoff	[mg l ⁻¹]	DEV, DIN 38406, T5
Nitrat-Stickstoff	[mg l ⁻¹]	AMWU (1986), T2
Nitrit-Stickstoff	[mg l ⁻¹]	NANOCOLOR® Nitrit 2 (Test 68), Macharey-Nagel GmbH & Co.KG
BSB ₅	[mg l ⁻¹]	DEV, DIN 38409, T52
CSB	[mg l ⁻¹]	DEV, DIN 38409, T41 und NANOCOLOR® CSB160 (Test 26) und CSB 1500 (Test 29), Macharey-Nagel GmbH & Co.KG

4.5 Batch-Versuche zur P-Freisetzung aus dem Belebtschlamm

Unter standardisierten Bedingungen, nach SCHEER (1996), wurde in Batch-Versuchen das P-Rücklöse- und P-Aufnahmeverhalten der Belebtschlämme ermittelt.

Der zu untersuchende Belebtschlamm (5 l) wurde aus dem Ablauf der Belebung entnommen und dessen oTS-Gehalt sowie die P_{Ges} - und die NO_3 -N-Konzentrationen im Filtrat bestimmt. Falls erforderlich, wurde Nitrat durch Acetat-Zugabe von 3-4 mg g^{-1} NO_3 -N unter anoxischen Bedingungen reduziert. Anschließend wurde der Schlamm bis zur völligen Phosphataufnahme belüftet.

Für die Bestimmung des P-Rücklösepotentials wurde dem Belebtschlamm unter schonendem Rühren (ohne Belüftung) 25 mg CH_3COOH g^{-1} TS als Substrat zugegeben und in regelmäßigen Abständen die Phosphatkonzentration im Überstand bestimmt. Die Phase der Phosphatrücklösung galt als beendet, wenn die Phosphatkonzentration im Überstand mindestens 2 h konstant blieb.

Zur Bestimmung der erhöhten biologischen Phosphoraufnahme wurde der Phosphatgehalt des Abwassers um 5-10 mg PO_4 -P l^{-1} aufgestockt (Abbildung 4.3, A) und der Belebtschlamm belüftet (Sauerstoffkonzentration >2 mg/l). Bei Belebtschlämmen mit einer sehr hohen Phosphatspeicherung kann eine weitere Aufstockung erforderlich sein. Diese Phase der P-Aufnahme beträgt mindestens 3 h, und zwar bis keine weitere Phosphataufnahme mehr nachweisbar ist und somit die Phosphatkonzentration im Überstand konstant bleibt.

Zur Auswertung der Batch-Versuche wurden die maximale Rücklöse (1)- bzw. Aufnahme (2) und die maximale Rücklösung bzw. Aufnahme bestimmt (Abbildung 4.3). Die Werte wurden auf die Trockenmasse (TS) bezogen.

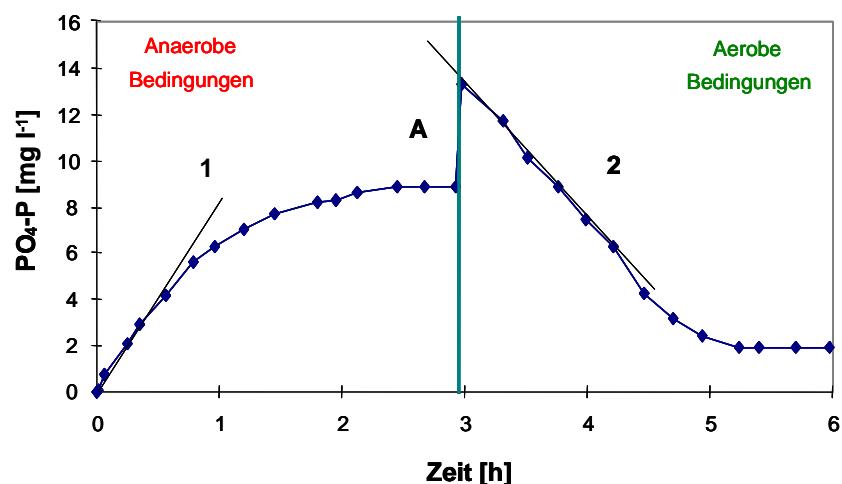


Abbildung 4.3: Phosphat-Konzentration im Überstand während des Batchversuchs (1: max. P-Rücklöserate; A: P-Aufstockung; 2: max. P-Aufnahmerate)

4.6 P-Fraktionierung nach Psenner

Die ursprünglich für Sedimente entwickelte Methode (PSENNER et al., 1984) wurde durch UHLMANN et al. (1990) für Belebtschlämme modifiziert und ermöglicht die Differenzierung verschiedener organischer und anorganischer Phosphorverbindungen und ihre quantitative Bestimmung. Dabei wird der Belebtschlamm hintereinander mit verschiedenen Extraktionsmitteln (Tabelle 4.7) behandelt und die Konzentrationen des *ortho*- und Gesamtphosphates in den Elutionslösungen bestimmt.

Für die P-Fraktionierung wurden 2x30 ml Belebtschlamm (zur Doppelbestimmung) aus den entsprechenden Becken entnommen und abzentrifugiert ($10.000 \text{ U min}^{-1}$, 10 min, 4°C). Der Überstand stellt die Fraktion des gelösten Phosphates dar (Ü-Fraktion). Das Pellet wurde anschließend hintereinander mit 25 ml des entsprechenden Extraktionsmittels inkubiert (Tabelle 4.7). Der pH-Wert der NaOH-Fraktion wurde vor der Phosphat-Analyse mit HCl auf pH 7 eingestellt.

Das ermittelte *ortho*-Phosphat entspricht dem gelösten reaktiven Phosphat (SRP), die Differenz zwischen Gesamtphosphat und *ortho*-Phosphat dem nichtreaktiven Phosphat (NRP) (SCHÖNBORN, 1998).

Tabelle 4.7: P-Fraktionen bei der Psenner-Fraktionierung (modifiziert nach UHLMANN ET AL, 1990)

Extraktionsmittel	Zeit/ Temp.	Extrahierte P-Verbindungen	
dest. Wasser (KW)	10 min 20°C	KW-SRP	Gelöste und locker adsorbierte Phosphate
		KW-NRP	Gelöste Polyphosphate bzw. Polyphosphatbruchstücke in der flüssige Phase, die beim Absterben und der Lyse der Zellen freigesetzt werden
Na-Hydrogencarbonat/ Dithionitlg. (BD)	30 min 40°C	BD-SRP	An Fe chemisch gebundenes bzw. an $\text{Fe}(\text{OH})_3$ adsorbiertes Phosphat
		BD-NRP	Wahrscheinlich Zellphosphat, das aufgrund der Temperatur von 40°C hydrolysiert und aus den Zellen herausgelöst wird
1 N NaOH	16 h 20°C	NaOH-SRP	An Al chemisch gebundenes bzw. an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiertes Phosphat
		NaOH-NRP	Hauptteil des organischen Phosphors (Nukleinsäurephosphate), Hauptteil der bei der erhöhten biologischen P-Elimination gebildeten Polyphosphate
0,5 N HCl	16 h 20°C	Ca- und Mg-Phosphate, evtl. Al-Phosphate, u.U. Restgehalt an org. Phosphaten	

Die Fraktion aus BD-NRP und NaOH-NRP setzt sich aus dem biologisch gebundenen Phosphat, d.h. organische Zellphosphate und Polyphosphate, zusammen. Das chemisch gebundene Phosphat (vor allem an Fe und Al) setzt sich aus der Summe BD-SRP, NaOH-SRP und der HCl-Fraktion zusammen. Diese Fraktionen treten verstärkt bei Belebtschlamm aus Kläranlagen mit chemischer Fällung auf.

4.7 Mikroskopische Untersuchungen

4.7.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Neben der TS- und GV-Bestimmung wurde als Biomassenparameter stichprobenartig die Gesamtzellzahl (GZZ) im Belebtschlamm der Versuchsanlagen bestimmt.

Zur Bestimmung der GZZ wurde ein Teil der ethanolfixierten Probe (siehe Kapitel 4.8.2) mit 1*PBS-Puffer 1:50 verdünnt und 3-mal 15s mit einer Ultraschallsonde (Sonoplus GM70, Bandelin electronics, Berlin) bei 50%iger Intensität unter Kühlung homogenisiert.

Die homogenisierte Probe wurde mit DAPI (Endkonzentration $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) 20 min im Dunkeln inkubiert und durch einen Membranfilter (Millipore, Isopore® Membrane Filters, $0,2 \mu\text{m}$ GTBP) filtriert.

4.7.2 Nachweis der Polyphosphatgranula

Für den Nachweis der Polyphosphatgranula im Belebtschlamm wurde eine Neisser-Färbung durchgeführt. Als Grundlage diente die Methode von EIKELBOOM & BUIJSEN (1992).

Zudem erfolgte ein Nachweis der eingelagerten Polyphosphate mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des Farbstoffes DAPI (Kapitel 4.8.6).

4.7.3 Differenzierung der fadenförmigen Bakterien

Die Differenzierung der fadenförmigen Bakterien im Belebtschlamm erfolgte nach EIKELBOOM & BUIJSEN (1992).

4.8 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

4.8.1 Beschichten der Objektträger

Die Objektträger (6 Aussparungen, Paul Marienfeld, Bad Mergentheim) wurden vor der Gelatine-Beschichtung mit Spülmittel entfettet, mit Aqua dest. gespült und danach getrocknet. Das Beschichten der Objektträger erfolgte nach der Methode von WAGNER (1995).

Gelatinebeschichtete Objektträger wurden bei allen quantitativen mikrobiellen Untersuchungen verwendet, um das Abspülen der Zellen bei den einzelnen Hybridisierungsschritten zu minimieren.

4.8.2 Fixierung der Belebtschlammproben

Die Fixierung der Belebtschlammproben erfolgte nach der Methode von MANZ et al. (1992).

Fixierung mit Paraformaldehyd (für GRAM-negative Bakterien)

Ein Teil der Zellsuspension wurde mit drei Teilen frisch hergestellter, gekühlter Paraformaldehydlösung (3,7%, sterilfiltriert) gemischt und mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die fixierte Probe mit 1*PBS-Puffer (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, abzentrifugiert (3 min bei 13.000 U min⁻¹), in 1*PBS-Puffer resuspendiert und mit dem gleichen Volumen eisgekühltem Ethanol (96%, p.A.) versetzt. Die so fixierten Zellen wurden bei -20°C gelagert.

Ethanolfixierung (für GRAM-positive Bakterien)

Die Belebtschlammproben wurden abzentrifugiert und mit 1*PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Probe in 1*PBS-Puffer resuspendiert und mit dem gleichen Volumen eisgekühltem Ethanol (96%, p.A.) versetzt.

4.8.3 Immobilisieren der Zellen

Die fixierten Belebtschlammproben wurden 1:20 verdünnt, 3-mal 10 s mit einer Ultraschallsonde (Sonoplus GM70, Bandelin electronics, Berlin) unter Kühlung mit 50%iger Intensität homogenisiert und mit Natriumpyrophosphat versetzt (Endkonzentration: 0,28 g l⁻¹). Anschließend wurden 4-8 µl dieser Bakteriensuspension auf die Objektträger aufgetragen.

Nach Trocknung bei 46°C wurden die Objektträger zur Dehydratisierung und Nachfixierung der Zellen je 3 min in 50, 80 und 96%iges Ethanol (je 3 min) getaucht. Die so behandelten Proben wurden bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur gelagert.

4.8.4 Hybridisierung der Belebtschlammproben

Hybridisierungslösungen

Je nach benötigter Stringenz wurde zum Standardhybridisierungspuffer Formamid in den Konzentrationen 10-40% zugegeben. Im Waschpuffer wurde die gewünschte Stringenz durch Veränderung der NaCl-Konzentration erreicht. Bei geringen NaCl-Konzentrationen (< 80 mM) wurde dem Waschpuffer EDTA zugegeben (Endkonzentration 5 mM), da ansonsten Spuren von zweiwertigen Kationen durch ihre Hybridstabilisierung die Stringenz beeinflussen können (WAGNER, 1995).

Lösungen:

EDTA-Lösung, 0,5 M, pH 8,0

Formamid p.A.

Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%ig, sterilfiltriert

Tris-HCl-Lösung, 1 M, pH 8,0

Standard-Hybridisierungspuffer:

0,9 M NaCl

10 mM Tris-HCl

0,01% SDS

Hybridisierung homogenisierter Proben

Auf jede Aussparung mit immobilisierten Zellen wurden 9 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (Konzentration 20-50 ng ml⁻¹) aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 46°C für 2 h. Die feuchte Kammer bestand aus einem 50 ml Probengefäß, in dem ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer getränktes Fließpapier lag.

Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer mit 48°C warmem Waschpuffer vom Objektträger abgespült und der Objektträger in ein Gefäß mit Waschpuffer gleicher Temperatur überführt. Nach 20-minütiger Waschphase wurde der Objektträger vorsichtig mit Aqua dest. abgespült und getrocknet.

Hybridisierung nicht homogenisierter Proben

Für die Hybridisierung in Lösung wurden 3 µl einer fixierten, nicht-homogenisierten Belebtschlammprobe für 3 min mit je 500 µl Ethanol (50, 80 und 90%) versetzt, zentrifugiert (3 min bei 1000 U min⁻¹) und anschließend das Pellet in 100 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Nach der Sedimentation wurden 5-10 µl der Probe mit dem Hybridisierungspuffer auf 45 µl aufgefüllt und 5 µl der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte 2 h bei 46°C. Am Ende der Hybridisierung wurden 500 µl Waschpuffer (48°C) hinzugegeben.

Nachdem sich der Belebtschlamm abgesetzt hatte, wurde der überstehende Waschpuffer abgenommen und durch neuen ersetzt. Das Waschen der Probe (20 min) erfolgte bei 48°C. Anschließend wurde der Belebtschlamm in 1*PBS-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Da im konfokalen Laserscanningmikroskop keine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI möglich war, wurde parallel zur spezifischen Cy3-markierten Oligonukleotidsonde eine Fluoresceinmarkierte EUB-Sonde eingesetzt.

4.8.5 Verwendete Oligonukleotidsonden

Für die Untersuchungen der Zusammensetzung der Bakterienbiozönose in den Belebtschlämmen wurden die in Anhang A-1 angeführten Oligonukleotidsonden (MWG Biotech, Ebersberg) eingesetzt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Cy3 und Fluorescein verwendet.

Die Konzentration der Oligonukleotidsonden wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Sonden wurden mit sterilem Aqua dest. auf eine Arbeitskonzentration von 50 ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Für die Sonden BET42a, GAM42a, NEU und Sna23a wurden unmarkierte Kompetitor-Sonden (Tabelle 4.8) verwendet, um die nötige Spezifität der Oligonukleotidsonden zu erreichen.

Tabelle 4.8: Kompetitor-Oligonukleotidsonden

Kompetitor für:	Sonde	Sequenz (5' - 3')	Referenz
BET42a	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	MANZ et al. 1992
GAM42a	BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	MANZ et al. 1992
NEU/ SNA23	CTE	TTCCATCCCCCTCTGCCG	WAGNER et al. 1996

4.8.6 Gegenfärbung mit DAPI

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Das Anregungsoptimum liegt bei 365 nm und sein Emissionsmaximum (DNA-Komplex) bei 456 nm (Abbildung 4.4). Demgegenüber verschiebt sich das Emissionsmaximum bei Bindung dieses Farbstoffes an Polyphosphatgranula von 456 nm nach 520 nm (ALLAN und MILLER, 1980). Daher kann DAPI auch zum Nachweis von Polyphosphatgranula in Mischkulturen eingesetzt werden.

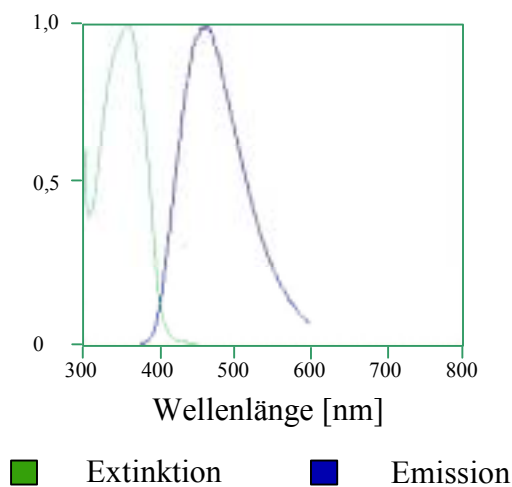


Abbildung 4.4: Extinktion und Emission des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI

Für die Gegenfärbung mit DAPI wurden pro Aussparung 40 μl DAPI-Arbeitslösung ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) auf den Objektträger aufgetragen. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Lösung mit Aqua dest. abgespült und der Objektträger getrocknet.

4.8.7 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte an einem Axioskop bzw. einem Jena-Lumar Fluoreszenzmikroskop (Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena). Die konfokale Laserscanningmikroskopie wurde an einem Leica TCS NT (Ar/Kr-Laser) durchgeführt. Die verwendeten Fluoreszenzfilter sind in der Tabelle 4.9 zusammengestellt.

Tabelle 4.9: Fluoreszenzfilterkombinationen

Farbstoff	Anregungsfilter	Farbteiler	Sperrfilter
DAPI (Poly-P)	BP 365	FT 395	LP 420
DAPI	D 360/40	400 DCLP	D460/50
Cy3	HQ 545/30	Q 565 LP	HQ 610/75
FITC	BP 450/40	FT 510	515/50

4.9 PCR-Analyse

4.9.1 DNA-Isolierung aus Belebtschlamm

Zur Isolierung der mikrobiellen DNA kam ein Teil der Ethanol-fixierten Probe (siehe Kapitel 4.8.2) zur Anwendung. Hierfür wurden 750 µl der fixierten Probe mit 1*PBS-Puffer gewaschen und anschließend wieder in 750 µl 1*PBS-Puffer resuspendiert. 500 µl dieser Probe wurde für den Zellaufschluss mittels Bead-Beater eingesetzt.

Durchführung:

- Zellaufschluss mittels Bead-Beater (Retsch, MM2000)
 - 500 µl Probe mit 500 µl TE-gesättigtem Phenol und 500 µl Zirkonium Beads (Durchmesser: 0,1 mm) versetzen
 - Zellaufschluss im Bead-Beater (10 min bei 100% Leistung)
 - Zentrifugation (5 min, 13.000 U min⁻¹)
- Überstand zweimal mit der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung extrahieren
 - Überstand (ohne Zwischenphase) in ein neues Gefäß überführen
 - 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:24:1; Vol.) hinzufügen
 - Vortexen (1 min)
 - Zentrifugation (5 min, 13.000 U min⁻¹)
- Überstand einmal mit der Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung extrahieren
 - Überstand (ohne Zwischenphase) in ein neues Gefäß überführen
 - 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1; Vol.) hinzufügen
 - Vortexen (1 min)
 - Zentrifugation (5 min, 13.000 U min⁻¹)
- Fällung der DNA mit Ethanol
 - 1 Vol. der extrahierten DNA mit 1 Vol. Ethanol (abs.) und 0,1 Vol. Na-Acetat (3 M, pH 4,8) mischen
 - Präzipitation der DNA über Nacht bei -20 °C
- Waschen der gefällten DNA mit 500 µl Ethanol (75% und 100%)
- Trocknen der isolierten DNA in einer Vakuumzentrifuge (MAXI dry lyo)

Die getrocknete DNA wurde in 50 µl T½E-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

4.9.2 Quantitative Analyse der extrahierten DNA

Zur Bestimmung der Konzentration der aus dem Belebtschlamm extrahierten DNA wurden die Eluate mit Aqua bidest. 1:100 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm mit einem Photometer (Pharmacia, Schweden) gemessen.

Zur Berechnung der Konzentration wurde die Gleichung von CRYER et al. (1975) verwendet.

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \approx 50 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ doppelsträngige DNA}$$

Für die Ermittlung der Verunreinigung der Eluate wurde der Quotient $\text{Ext}_{260\text{nm}}/\text{Ext}_{280\text{nm}}$ berechnet. Nach MARMUR (1961) sollte dieser größer 1,8 sein.

4.9.3 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene bzw. des amoA-Gens (kodiert für die Ammonium-Monooxygenase) erfolgte mit Hilfe der PCR (SAIKI et al., 1988). Die Spezifität der PCR wurde durch die eingesetzten Primer bestimmt.

Für den allgemeinen DNA-Nachweis und die Klonierung mit anschließender Sequenzierung wurde mit dem universellen Primerpaar TPU1 (27F) und 1387r (MARCHESI et al., 1998) gearbeitet. Bei der T-RFLP-Analyse wurde dasselbe Primerpaar verwendet, jedoch war der TPU1-Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAMTM markiert.

Das spezifische Primerpaar amoA-F und amoA-R (ROTTHAUWE et al., 1997) wurde für den Nachweis der Ammonium oxidierenden Bakterien und deren Identifizierung mittels Klonierung und Sequenzierung eingesetzt.

Alle Analysen wurden mit der AmpliTaqGoldDNA-Polymerase (Applied Biosystems) in einem GeneAmp PCR System 9600 thermal cycler (Perkin Elmer) durchgeführt.

Reagenzien

AmpliTaQGold TM Polymerase: (Applied Biosystems)	Konz.: 5 Unit μl^{-1}
10x PCR-Puffer: (Applied Biosystems)	Konz.: 15 mM MgCl_2
dNTP: (Promega) Corporation, 1:5 verdünnt angewendet)	Konz.: 10 mM (each)
Primer: (Interactiva)	Konz.: 10 pmol μl^{-1}

Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Autor
TPU1 (27F)	CCG AAT TCG TCG ACA AC	MARCHESI et al., 1998
1387r	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	MARCHESI et al., 1998
amoA-F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	ROTTTHAUWE et al., 1997
amoA-R	CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	ROTTTHAUWE et al., 1997
M13 F (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G	TOPO [®] TA-Cloning Kit, Invitrogen Co.
M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO [®] TA-Cloning Kit, Invitrogen Co.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Die PCR-Ansätze setzten sich nach folgendem Schema zusammen:

36,75	µl	Aqua bidest.
5	µl	10x PCR-Puffer
5	µl	dNTP-Mix
1	µl	forward Primer
1	µl	reverse Primer
0,25	µl	Taq-Polymerase
1	µl	Template-DNA (10-100 ng)

Der fertige Mastermix wurde vor Zugabe der Template-DNA mit Hilfe von Microcon YM-100 Säulen (Amicon) aufgereinigt, um evtl. vorhandene Fremd-DNA zu entfernen.

4.9.3.1 Universelle-PCR

Die universelle PCR wurde mit den Primern 27F und 1387R durchgeführt. Das PCR-Programm besaß folgende Temperaturgradienten:

Initiale Denaturierung	94°C	9 min
DNA-Amplifikation (35 Zyklen)		
Denaturierung	94°C	2 min
Primer- Annealing	55°C	2 min
Extension-Reaktion	72°C	2 min
Final Extension	72°C	10 min
Final Holding	4°C	∞ min

4.9.3.2 Spezifische PCR für die Ammonium-Monooxygenase

Für den Nachweis der Ammonium oxidierenden Bakterien wurde das Primer-Paar amoA-F und amoA-R (ROTTHAUWE et al., 1997) eingesetzt. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min
DNA-Amplifikation (42 Zyklen)		
Denaturierung	94°C	1 min
Primer-Annealing	60°C	1,5 min
Extension-Reaktion	72°C	1,5 min
Final Extension	72°C	10 min
Final Holding	4°C	∞ min

4.9.3.3 Amplifikation der Plasmid-Inserts

Für den Nachweis der in *E. coli* klonierten PCR-Produkte wurden die Primer M13 F (-20) und M13 R, die im TOPO® TA-Cloning Kit (Invitrogen AG) enthalten waren, verwendet. Folgendes Cyclex-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	9 min
DNA-Amplifikation (30 Zyklen)		
Denaturierung	94°C	1 min
Primer-Annealing	55°C	1 min
Extension-Reaktion	72°C	1,5 min
Final Extension	72°C	10 min
Final Holding	4°C	∞ min

4.9.4 Nachweis der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese (140 mA, max. Spannung) durchgeführt. Hierfür wurden 9 µl des PCR-Produkts mit 1 µl Ladepuffer gemischt und auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Größe des PCR-Fragmentes wurde anhand eines Längenstandards (Smart Ladder [0,1-10 kb] bzw. Smart Ladder SF [0,1-1,0 kb], Eurogentec, Belgien) abgeschätzt.

4.9.5 Klonierung

Für die Klonierung wurden Primer und Nukleotide aus dem PCR-Produkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) entfernt. Die eigentliche Klonierung erfolgte gemäß dem Protokoll des TOPO® TA-Cloning Kits in TOP10F'One Shot® *E. coli*. Je Klonierung wurden 2 µl der PCR-Produkte eingesetzt.

Die Selektion der TOP10F'One Shot® *E. coli* wurde entsprechend dem Protokoll auf einem mit IPTG und X-Gal ergänztem LB-(Luria-Bertani) Medium (1,0% Trypton, 1,0% NaCl, 0,5% Hefe-Extract, pH: 7,0) durchgeführt.

Zum Nachweis der klonierten DNA wurde unter Verwendung des M13 Forward (-20)- und des M13 Reverse Primers eine PCR durchgeführt.

4.9.6 Sequenzierung

4.9.6.1 Zyklische Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte der klonierten DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN®) aufgereinigt. Anschließend wurden 2 µl der aufgereinigten PCR-Produkte in die zyklische Sequenzierung, für die der ABI PRISM BigDye™ RR Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet wurde, eingesetzt. Bei diesem Kit erfolgte die Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode nach SANGER (1977), bei der die Synthese des Komplementär-Stranges durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTP) unterbrochen wird. Als Primer wurden der TPU1-Primer für die 16S rDNA-Analyse bzw. der M13 Forward (-20)-Primer zur Analyse der Ammonium oxidierenden Bakterien eingesetzt.

Der Mastermix für die zyklische Sequenzierung hatte entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Applied Biosystems) folgende Zusammensetzung:

4,5 µl	Aqua bidest.
1,5 µl	Premix (Applied Biosystems)
2 µl	Primer
2 µl	Template-DNA (10-100 ng)

Für die zyklische Sequenzierung wurde das folgende Temperatur-Programm verwendet.

Initiale Denaturierung	96°C	0 min
DNA-Amplifikation (25 Zyklen)		
Denaturierung	96°C	10 s
Primer-Hybridisierung	¹⁾ 55°C	5 s
	²⁾ 60°C	5 s
Extension-Reaktion	60°C	0 min
Final Extension	60°C	4 min
Final Holding	4°C	∞ min

¹⁾ Diese Temperatur wurde für den Primer M13 F (-20) eingesetzt

²⁾ Diese Temperatur wurde für die Primer amoA-F, RTU 4 und TPU 3 eingesetzt

Vor der Analyse auf einem ABI PRISM-System 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) wurden überschüssige BigDye-Terminatoren mittels Ethanol-fällung aus den Sequenzierungsreaktionen entfernt. Dazu wurden diese mit 35 µl abs. Ethanol (Merck) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 14.000 U min⁻¹) wurde der überschüssige BigDye-Terminatoren enthaltende Überstand abgenommen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

4.9.6.2 Vergleichende 16S rDNA Analyse

Die Analyse der 16S rDNA- und amoA-Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm Husar 4.0 (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources; DKFZ [<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>]). Weitere Sequenz- und Datenbankvergleiche wurden mit den Programmen FASTA und BLASTN des NCBI (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) durchgeführt.

4.9.7 T-RFLP-Analyse

Die Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analyse stellt neben verschiedenen anderen Fingerprint-Methoden, wie z.B. der DGGE (Muyzer et al., 1993) oder TGGE (FELSKE et al., 1997), ein wichtiges Verfahren zur Analyse von komplexen Umweltproben dar (LIU et al., 1997).

Bei dieser modifizierten RFLP-Methode (SWAMINATHAN & MATAR, 1993) werden ein oder zwei markierte, z.B. fluoreszenzgelabelte, Primer zur Amplifikation der entsprechenden Sequenz eingesetzt. Nach dem Restriktionsverdau der PCR-Produkte werden die Längen der markierten terminalen Fragmente anhand eines internen Standards, z.B. mit Hilfe eines Sequenzers, bestimmt. Bei Umweltproben ergeben sich aufgrund der darin enthaltenen Organismen Profile von unterschiedlichen Fragmentlängen (Abbildung 4.5).

Zur Analyse von Umweltproben werden neben PCR-Produkten, die mit universellen oder spezifischen 16S rDNA-Primern (LIU et al., 1997) amplifiziert wurden, auch Amplifikate von Genen für Schlüsselenzyme spezifischer Stoffwechselleistungen in die T-RFLP-Analyse eingesetzt, z.B. Amplifikate des Ammoniummonooxygenase-Gens (amoA-Gen) (HORZ et al., 2000 und 2001).

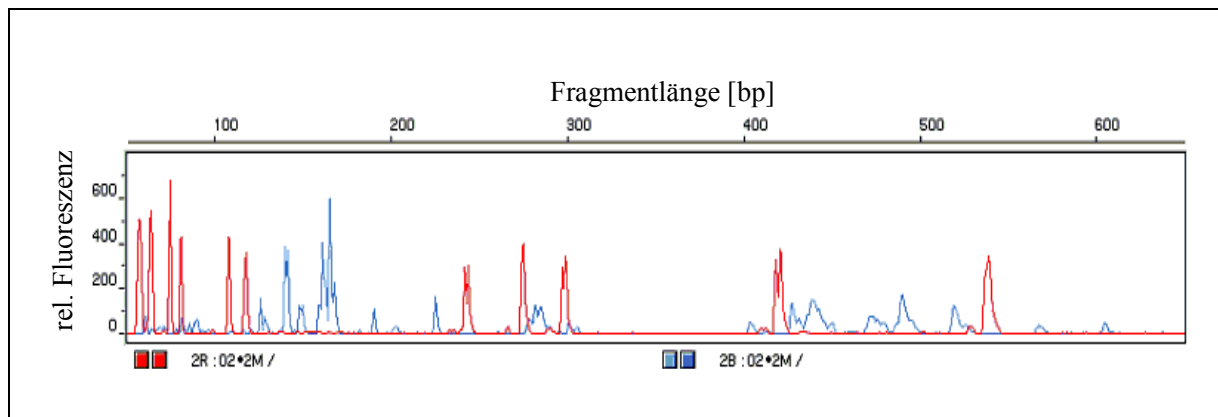


Abbildung 4.5: T-RFLP-Profil einer Belebtschlammprobe aus der A/O-Anlage (rot: interner Standard; blau: Fragmentlängen-Profil)

Durch einen Vergleich der Fragmentlängen, die bei T-RFLP-Analysen derselben Belebtschlammproben mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen auftreten, lassen sich mittels Datenbankvergleich Aussagen über beteiligte Organismen bzw. Organismen-Gruppen machen. Je größer die Anzahl der eingesetzten Restriktionsenzyme ist, desto exakter lassen sich den einzelnen Fragmentlängen bestimmte Organismen zuordnen.

Im Rahmen der T-RFLP-Analysen wurden mit TPU1 (hier FAMTM gelabelt) und 1387r die gleichen Primer eingesetzt, wie für die Erstellung der 16S rDNA-Genbibliotheken.

Der Restriktionsverdau der amplifizierten 16S rDNA wurde mit zwei Restriktionsendonukleasen der Klasse II durchgeführt, deren Erkennungssequenzen in Abbildung 4.6 dargestellt sind. Diese Enzyme schneiden innerhalb ihrer Erkennungssequenz und erzeugen im Fall des Enzyms *MspI* sticky ends, bzw. blunt ends im Fall des Enzyms *RsaI*.

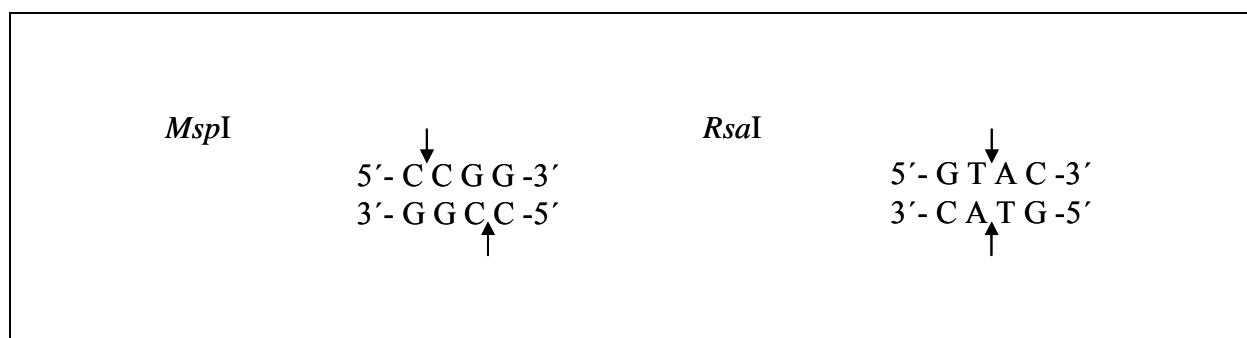


Abbildung 4.6: Erkennungssequenzen der eingesetzten Restriktionsenzyme

Der Restriktionsverdau der PCR-Produkte erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (New England BioLabs Inc.). In Tabelle 4.10 sind die Volumina der einzelnen Lösungen für einen Ansatz von 10 µl zusammengestellt.

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (10 µl)

	Reaktionsansatz für	
	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>
Enzym	1 µl	1 µl
Puffer	1 µl Puffer 2	1 µl Puffer 1
PCR-Produkt	8 µl	8 µl

Die Analyse der verdauten PCR-Produkte erfolgte auf einem automatischen Sequenziersystem (ABI PRISM-System 377 DNA Sequencer; Applied Biosystems). Hierfür wurden 3,5 µl des Restriktionsansatzes mit 2,5 µl Formamid und 0,5 µl des internen Längenstandards (GenScan 1000Rox) versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Die Auswertung der ermittelten Rohdaten erfolgte anschließend mit Hilfe des GeneScan Analysis Software Pakets (Applied Biosystems).

Für die weitere Auswertung der T-RFLP-Analysen wurde die TORAST-Software (**T-RFLP Operation Results Analyse Software**) eingesetzt. Diese wurde am Institut für Mikrobiologie der TU Dresden entwickelt (LUDWIG, 2002) und enthielt z. Zt. der Auswertung Angaben zu den Restriktionsfragmenten von ca. 50.000 16S rDNA-Einträgen. Durch einen regelmäßigen Abgleich mit der NCBI-Datenbank wird die zugrundeliegende Datenbank immer wieder aktualisiert und enthält somit auch die 16S rDNA-Einträge neuerer Untersuchungen. Die Software ermöglicht zudem durch vielseitige Features, wie z.B. Such- und Darstellungsfunktionen, einen detaillierten Vergleich von Fragmentprofilen verschiedener Organismen bzw. Organismengruppen.

Des Weiteren stand das TAP T-RFLP Analysis Programm [<http://rdp.cme.msu.edu/html/TAP-trflp.html>] (MARSH et al., 2000) zur Analyse der erhaltenen Fragmentmuster zur Verfügung. Dieses Programm ist frei im Netz verfügbar, jedoch aufgrund der geringeren Anzahl an enthaltenen Sequenzen, ca. 12.000, im Vergleich zur TORAST-Software (ca. 50.000 Datenbank-Eintragen) zur Analyse von Umweltproben weniger geeignet.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Reinigungsleistungen der untersuchten Anlagen

5.1.1 Reinigungsleistung der Versuchsanlagen

5.1.1.1 A/O-Anlage

Da das Roh-Abwasser der Kläranlage Bad Liebenwerda mit einem aufgestockten Leitungswasser (Kapitel 4.3.2) verdünnt wurde, besitzt das Abwasser, mit dem die Versuchsanlagen betrieben wurden, etwas niedrigere CSB- (Mittelwert: 826 mg O₂ l⁻¹) und BSB₅- (Mittelwert: 436 mg O₂ l⁻¹) Konzentrationen (Abbildung 5.1). Die durchschnittliche Schlammbelastung der Anlage betrug ca. 0,45 kg BSB₅*kg TS⁻¹*d⁻¹. Das Schlammalter lag bei etwa 4 Tagen.

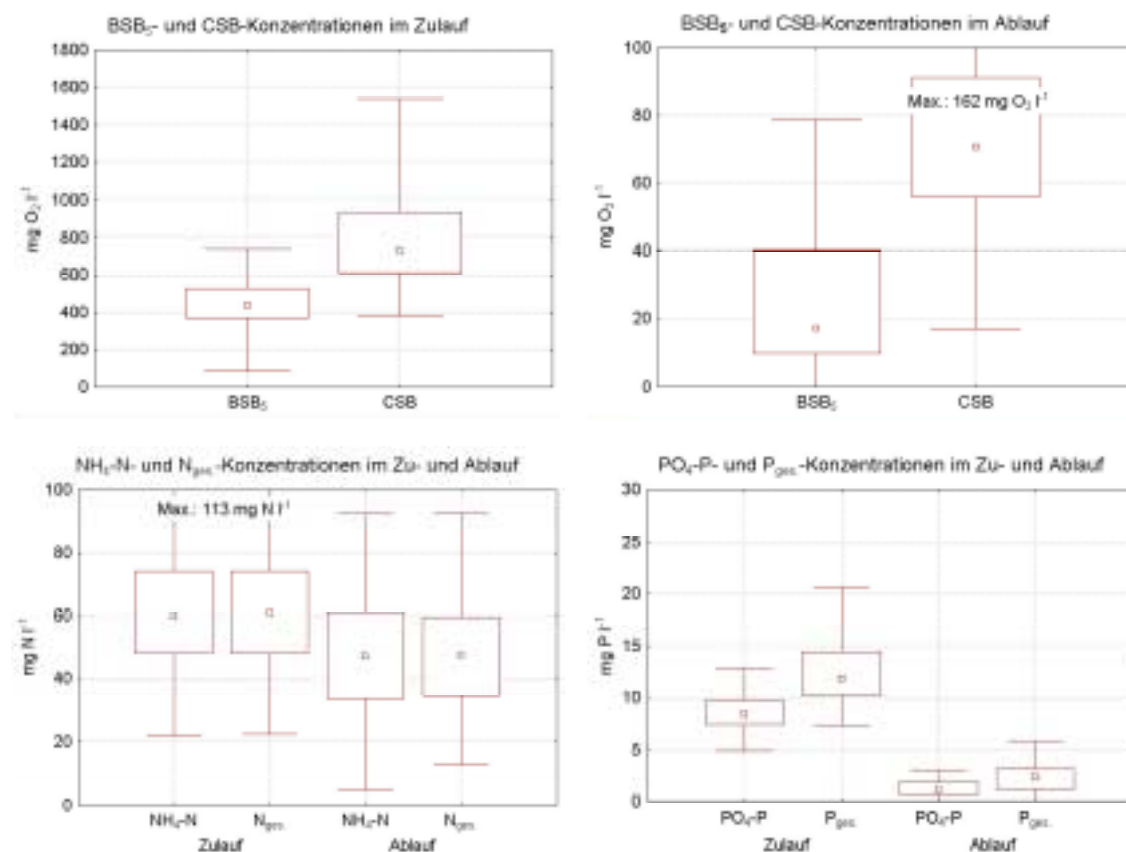


Abbildung 5.1: Chemische Zusammensetzung des Zu- und Ablaufes der A/O-Anlage

Mit medialen Ablaufkonzentrationen von 20 mg O₂ l⁻¹ BSB₅ bzw. 70 mg O₂ l⁻¹ CSB wurden die geforderten Grenzwerte für Anlagen der Größenklasse 2 [60-300 kg BSB₅(roh) d⁻¹] erreicht (Abbildung 5.1).

Die Phosphatkonzentration konnte mittels der erhöhten biologischen Phosphatelimination von durchschnittlich $13 \text{ mg P}_{\text{ges.}} \text{ l}^{-1}$ auf $2,5 \text{ mg P}_{\text{ges.}} \text{ l}^{-1}$ reduziert werden. Wie zu erwarten war, wurde der Ammoniumstickstoff nur um ca. 22% von 61 mg l^{-1} auf 49 mg l^{-1} reduziert. Diese Eliminierung wird weitestgehend der Biomasseproduktion des Belebtschlammes zugeschrieben.

5.1.1.2 AS-Anlage, ohne Anaerobbecken

Die Eliminationsrate der organischen Kohlenstoffverbindungen lag in der AS-Anlage mit ca. 98% (BSB_5) in einem vergleichbaren Bereich wie in der A/O-Anlage. Die Median der Ablaufkonzentrationen lag bei ca. $10 \text{ mg BSB}_5 \text{ l}^{-1}$ bzw. 75 mg CSB l^{-1} (Abbildung 5.2).

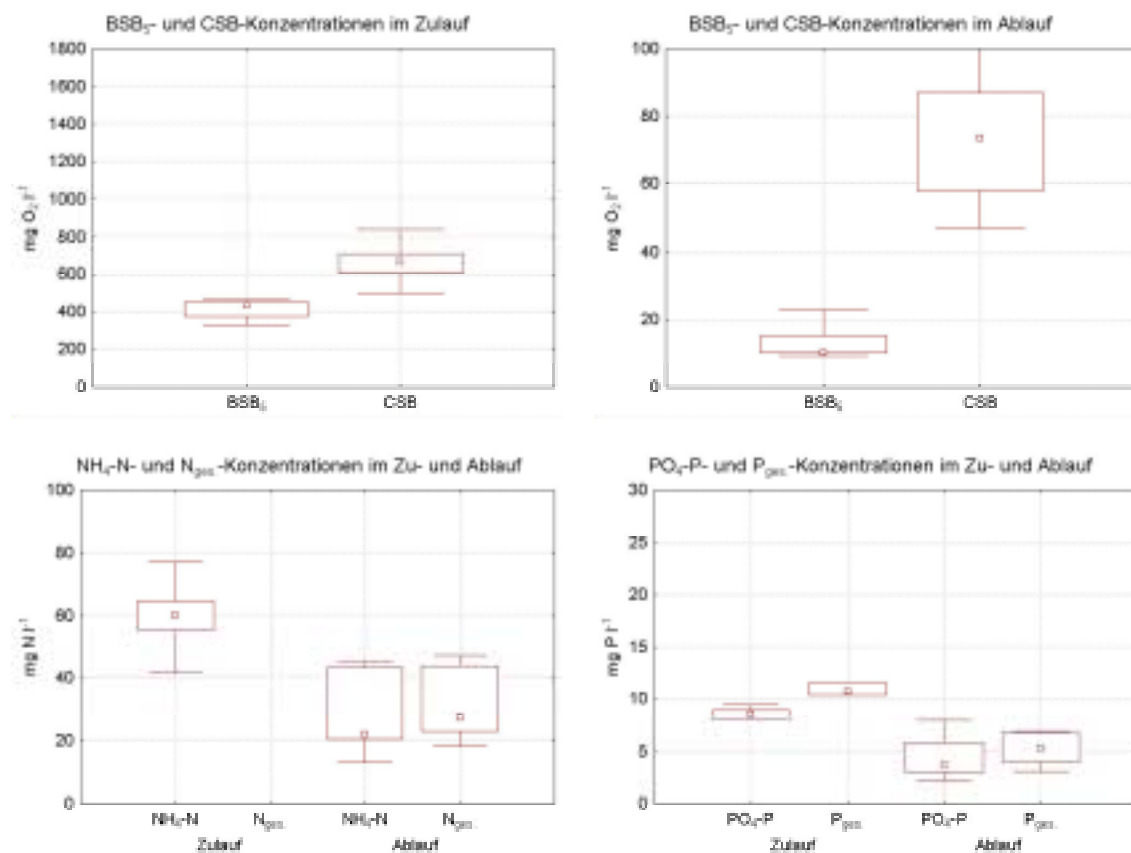


Abbildung 5.2: Chemische Zusammensetzung des Zu- und Ablaufes der AS-Anlage

Demgegenüber zeigte sich eine deutlich reduzierte $\text{P}_{\text{ges.}}$ -Elimination, die mit zunehmender Versuchsdauer von ca. 75% bis auf 40% sank. Die $\text{P}_{\text{ges.}}$ -Konzentration im Ablauf stieg von ca. $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ auf $6,7 \text{ mg l}^{-1}$. Ammonium wurde im Untersuchungszeitraum zu ca. 45% eliminiert. Damit lag die Eliminationsrate für Ammonium im Vergleich zur A/O-Anlage etwas höher. Ursache könnte hier die durchschnittlich höheren Temperaturen (ca. 20°C) im Untersuchungszeitraum sein, die zu einer erhöhten Stoffwechselleistung der Bakterien führte.

5.1.1.3 Phoredox-Anlage

In der Phoredox-Anlage wurden die leicht abbaubaren organischen Verbindungen, bestimmt als BSB₅, zu über 97% aus dem Abwasser entfernt. Die BSB₅-Konzentrationen im Ablauf lagen im Durchschnitt unter 15 mg l⁻¹. Trotz der großen Schwankungen der Zulaufkonzentrationen, was eine sehr unterschiedliche Belastung der Anlage zur Folge hatte, wurde das Ammonium des Abwassers zu über 95% auf durchschnittlich 3 mg NH₄-N l⁻¹ reduziert (Abbildung 5.3). Die Nitratkonzentration im Ablauf lag bei 9 mg NO₃-N l⁻¹.

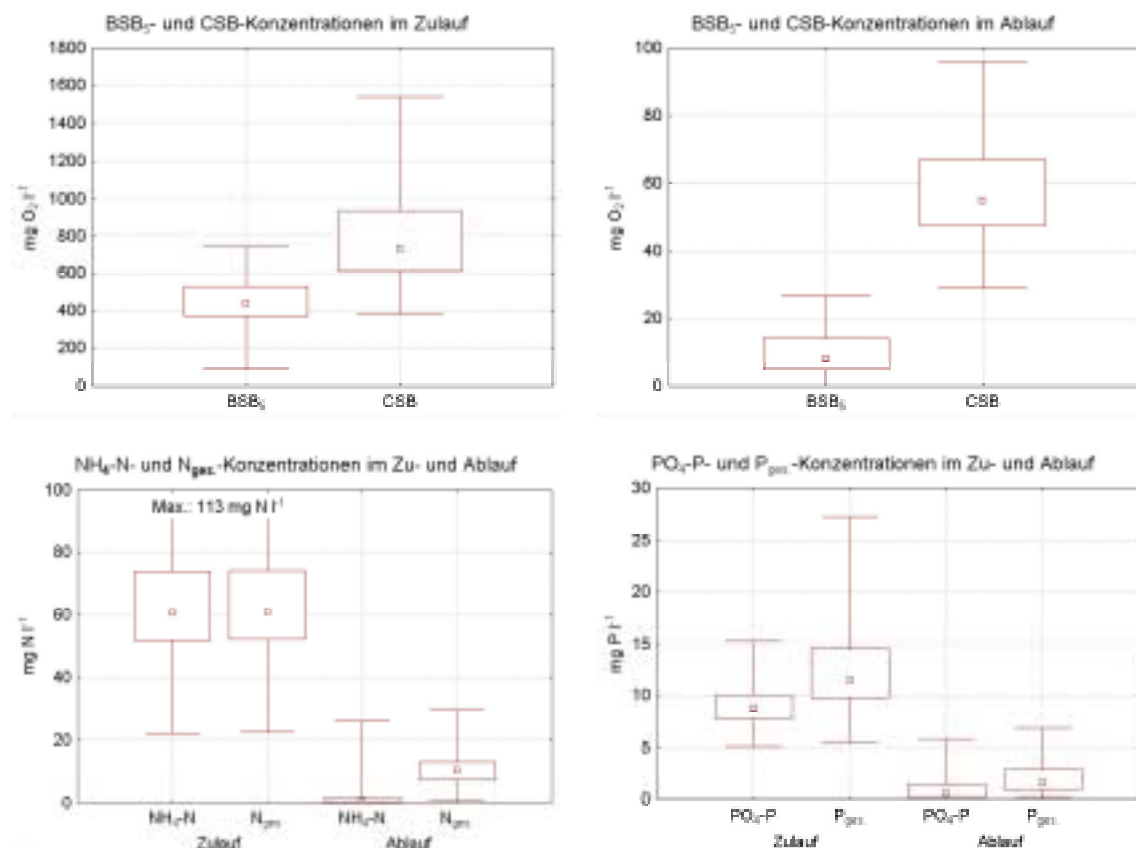


Abbildung 5.3: Chemische Zusammensetzung des Zu- und Ablaufes der Phoredox-Anlage

Ebenfalls sehr gut wurde Phosphat eliminiert. Auch hier konnten die Ablaufkonzentrationen trotz der z.T. erheblichen Schwankungen der Zulaufwerte im Durchschnitt auf unter 2 mg P_{ges} l⁻¹ gesenkt werden. Die zum Teil auftretenden erhöhten Ablaufkonzentrationen des P_{ges} lassen sich durch die extremen Zulaufkonzentrationen (bis 27 mg P_{ges} l⁻¹) und durch eine hohe Sauerstoffzehrung in der Belebung erklären, die durch die hohe organische Belastung des Abwassers verursacht wurde.

5.1.2 Reinigungsleistung der kommunalen Kläranlagen

5.1.2.1 KA Bad Liebenwerda

Aufgrund des hohen Schlammalters (80 Tage) wurde die organische Belastung des Abwassers zu über 99% abgebaut, was eine deutliche Unterschreitung der gesetzlichen Grenzwerte zur Folge hatte. Im Ablauf wurden BSB₅- bzw. CSB-Konzentrationen von durchschnittlich 8 bzw. 55 mg O₂ l⁻¹ erreicht.

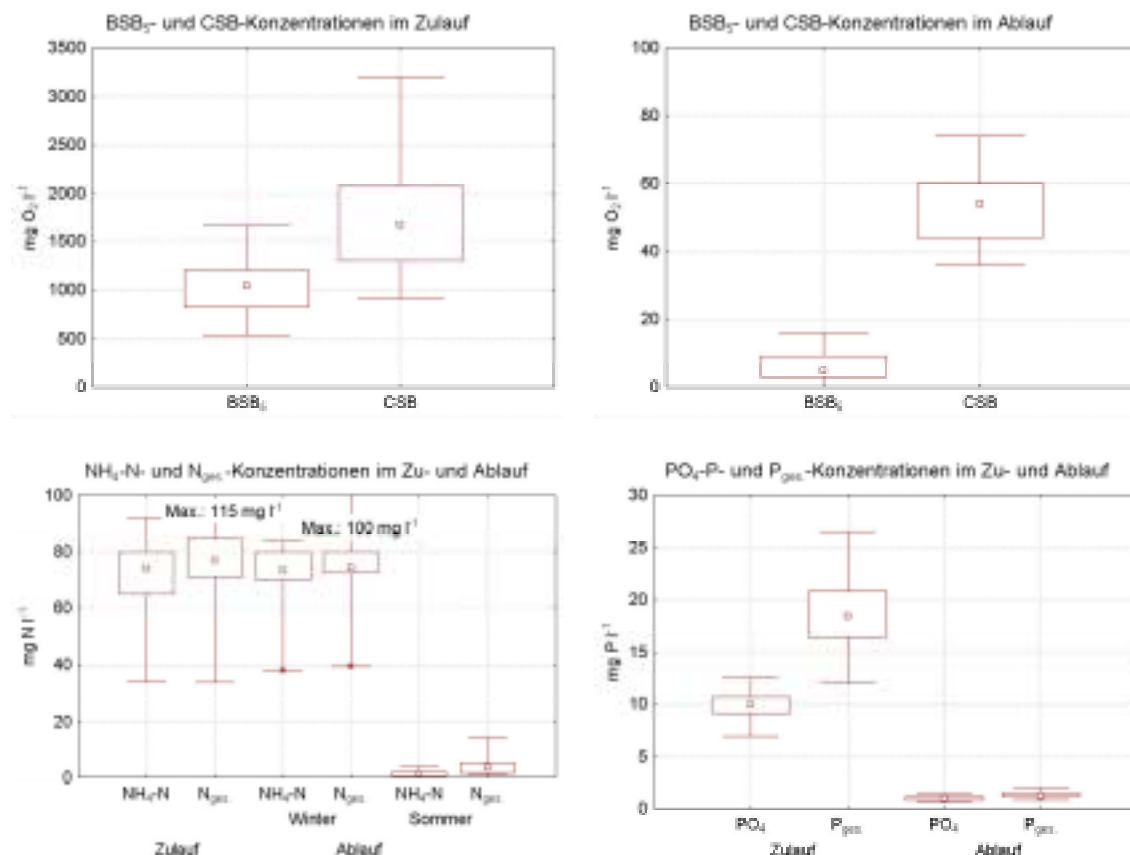


Abbildung 5.4: Chemische Zusammensetzung des Zu- und Ablaufes der Kläranlage Bad Liebenwerda

Der Wechsel zwischen aeroben und anoxischen/anaeroben Verhältnissen für eine biologische Stickstoff- und Phosphorelimination wurde durch eine intermittierende Belüftung der Belebung realisiert. Mit dieser Verfahrenstechnik konnte in den Sommermonaten eine Ammoniumelimination von durchschnittlich 98% erreicht werden. Dagegen war trotz des hohen Schlammalters bei Abwasser-Temperaturen unter 6°C eine weitestgehende Stickstoffelimination mit diesem Verfahren nicht mehr möglich. Die durchschnittlichen Ablaufkonzentrationen lagen bei vergleichbaren Schlammbelastungen im Sommer bei 1,5 mg NH₄-N l⁻¹ bzw. 4,4 mg NO₃-N l⁻¹ und im Winter bei 75 mg NH₄-N l⁻¹ bzw. 3,5 mg NO₃-N l⁻¹.

Demgegenüber konnte mit Hilfe der intermittierenden Belüftung im gesamten Jahresverlauf eine biologische Phosphatelimination $> 93\%$ erzielt werden. Die Phosphorkonzentrationen im Ablauf lagen im Durchschnitt unter $1,5 \text{ mg P}_{\text{ges.}} \text{ l}^{-1}$. Bei auftretenden Grenzwertüberschreitungen aufgrund hoher Zudosierung von Fäkalien bzw. technischer Störungen wurde zusätzlich eine chemische Fällung mit Eisenchlorid (FeCl_3) durchgeführt.

5.1.2.2 KA Elsterwerda

Aufgrund der niedrigen Schlammbelastung ($0,044 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}^{-1} \text{ TS Tag}^{-1}$) wurde das hoch konzentrierte Abwasser ($1900 \text{ mg BSB}_5 \text{ l}^{-1}$) in der Kläranlage Elsterwerda zu über 99% (BSB_5) gereinigt. Die Restkonzentrationen im Ablauf lagen unter $4 \text{ mg BSB}_5 \text{ l}^{-1}$. Auch die CSB-Konzentrationen im Ablauf waren mit $< 40 \text{ mg CSB l}^{-1}$ im Vergleich zu den anderen Anlagen am niedrigsten (Abbildung 5.5).

Aufgrund der hohen Durchschnittstemperatur des Abwassers ($> 20^\circ\text{C}$) konnte in dieser Kläranlage im gesamten Jahresverlauf eine stabile biologische Stickstoffelimination beobachtet werden. Die Stickstoffkonzentrationen im Ablauf lagen bei durchschnittlich $9 \text{ mg N}_{\text{ges.}} \text{ l}^{-1}$ mit einem Ammoniumanteil von kleiner $1,2 \text{ mg NH}_4\text{-N l}^{-1}$.

Phosphat wurde mit Ausnahme der Monate Juli und August ohne Dosierung von Fällungsmittel (FeCl_3) durch eine erhöhte biologische Phosphatelimination aus dem Abwasser entfernt. Wie auf der Kläranlage Bad Liebenwerda wurde eine chemische Fällung nur bei erhöhten Phosphatkonzentrationen im Ablauf durchgeführt.

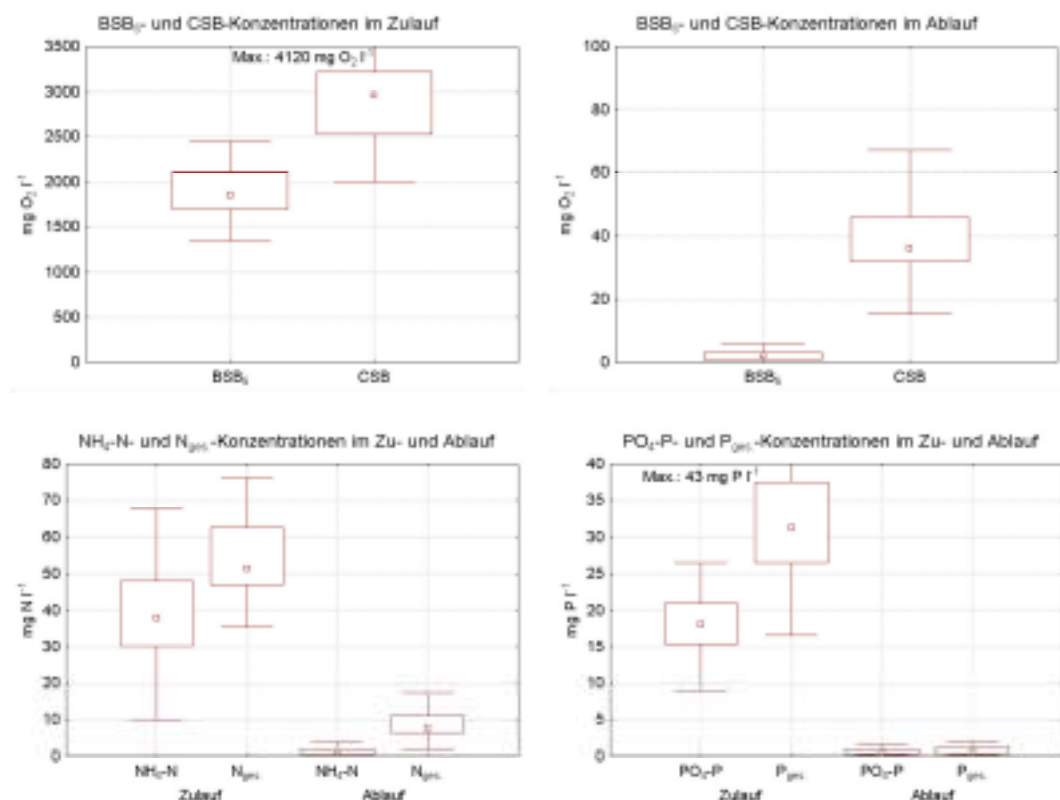


Abbildung 5.5: Chemische Zusammensetzung des Zu- und Ablaufes der Kläranlage Elsterwerda

5.1.2.3 KA Kaditz

Das Abwasser der Kläranlage Kaditz war mit durchschnittlich $210 \text{ mg BSB}_5 \text{ l}^{-1}$ bzw. $440 \text{ mg CSB l}^{-1}$ im Vergleich zu den anderen Kläranlagen bzw. zu den Versuchsanlagen weitaus weniger konzentriert. Dementsprechend niedriger lagen auch die Phosphat- und Ammoniumkonzentrationen (Abbildung 5.6).

Der Abbau der organischen Substanzen, gemessen als BSB_5 , erfolgte durch die Kläranlage zu 94%. Die Ablaufwerte lagen mit $13,3 \text{ mg BSB}_5 \text{ l}^{-1}$ bzw. $67,1 \text{ mg l}^{-1}$ deutlich unterhalb der geforderten Grenzwerte (Abbildung 5.6).

Aufgrund der hohen Schlammbelastung ($2,2 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}^{-1} \text{ TS Tag}^{-1}$) und des niedrigen Schlammalters (2 Tage) wird in der Kläranlage Kaditz Ammonium nur im Rahmen des Bakterienwachstums aus dem Abwasser eliminiert (ca. 6%). Eine biologische Oxidation zu Nitrat wurde nicht beobachtet. Phosphat wurde, wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben, mittels chemischer Fällung (FeCl_3) aus dem Abwasser entfernt.

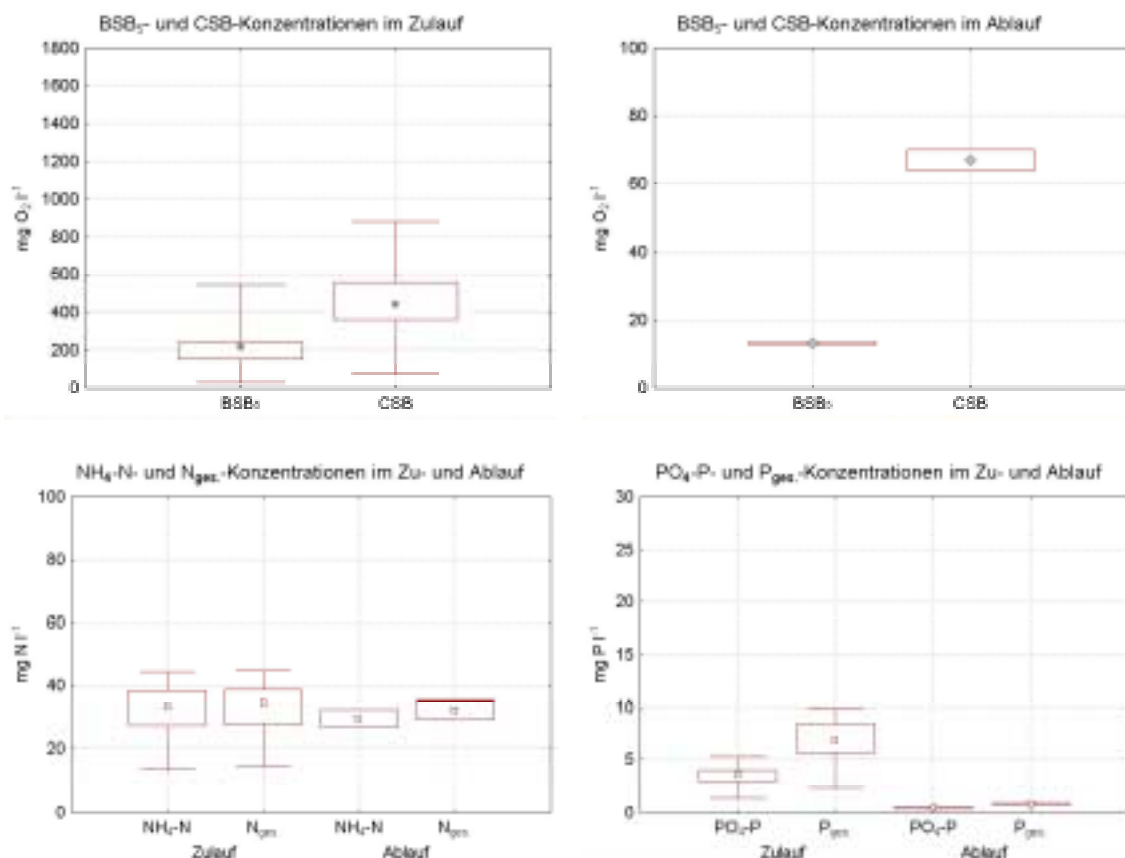


Abbildung 5.6: Chemische Zusammensetzung des Zu- und Ablaufes der Kläranlage Kaditz. Die Ablaufkonzentrationen wurden aus den Mittelwerten von Juni und Juli berechnet.

5.2 Untersuchungen zur biologischen Phosphor-Elimination

5.2.1 P-Freisetzungsraten in den Versuchsanlagen

Im Folgenden sollen die anaeroben P-Freisetzungsraten in den Versuchsanlagen, die nach dem A/O- und dem Phoredox-System betrieben wurden, miteinander verglichen werden. Beide Anlagen besaßen im Untersuchungszeitraum eine ähnliche Bemessungsgröße (11 EWG) und wurden mit dem gleichen Abwasser beschickt.

In der Abbildung 5.7 ist zu erkennen, dass im Anaerobbecken der Phoredox-Anlage eine deutlich höhere P-Freisetzung im Vergleich zur A/O-Anlage stattfand. Bezieht man die gemessenen Phosphatkonzentrationen auf die Trockenmasse, so erhält man durchschnittliche Freisetzungsraten von $2,8 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$ (A/O-Anlage) bzw. $5,2 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$ (Phoredox-Anlage). Ein Grund für die höhere Freisetzungsrates ist die höhere Verweilzeit des Belebtschlammes im Anaerobbecken der Phoredox-Anlage. Diese beträgt rechnerisch ca. 60 min im Vergleich zu 40 min in der A/O-Anlage.

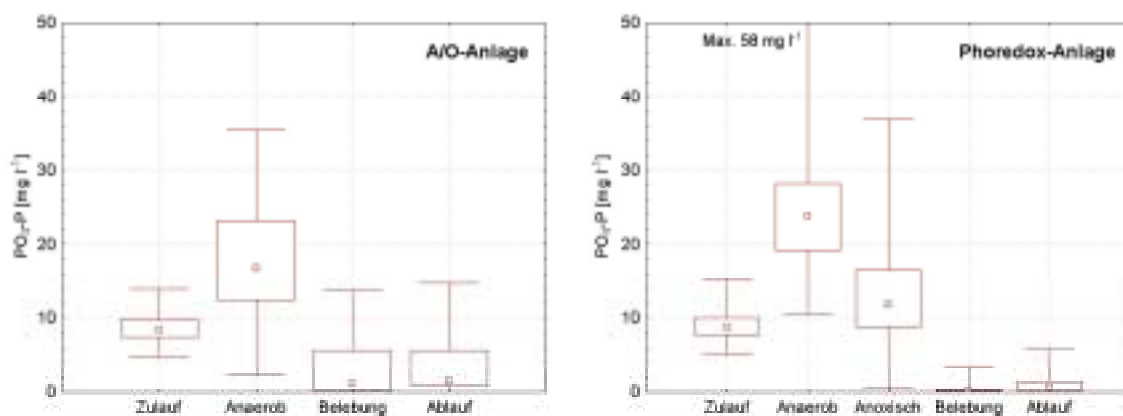


Abbildung 5.7: Phosphatkonzentrationen in den verschiedenen Becken der Versuchsanlagen

Die AS-Anlage wurde in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt, da bei diesem Verfahren keine anaerobe Phase auftritt. Da es jedoch im Nachklärbecken aufgrund anaerober Verhältnisse zu einer Phosphatfreisetzung ($< 0,4 \text{ mg P g}^{-1} \text{ TS}$) kam, musste von einem kleinen Potential einer erhöhten biologischen Phosphatelimination ausgegangen werden. Dies konnte auch in zusätzlichen Batch-Versuchen (Kapitel 5.2.3) bestätigt werden.

5.2.2 Abhängigkeit der P-Freisetzung von der Temperatur

In den Untersuchungen zur P-Freisetzung zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit zur Temperatur des Abwassers. In Abbildung 5.8 wurde die im Untersuchungszeitraum ermittelte P-Freisetzung, bezogen auf die Trockenmasse, der Abwassertemperatur gegenübergestellt. Trotz der hohen Schwankungen der P-Freisetzung ist für die Phoredox-Anlage eine signifikante Korrelation zur Abwassertemperatur zu erkennen ($r = 0,69$). In der A/O-Anlage ist die Tendenz dagegen nicht so deutlich ausgeprägt ($r = 0,43$).

Eine Abhängigkeit der P-Freisetzung von der Temperatur wurde von mehreren Autoren sowohl an Reinkulturen als auch in Belebtschlammanlagen beobachtet (z.B. HELMER & KUNST, 1998). Der ermittelte Temperatur-Koeffizient Q_{10} von ca. 1,6 entspricht ebenfalls den Werten, die HELMER (Q_{10} : 1,2) bzw. MARAIS et al. (Q_{10} : 1,52) für entsprechend adaptierten Belebtschlamm ermittelten (HELMER & KUNST, 1998).

Solche temperaturbedingten Veränderungen der mikrobiellen P-Freisetzung können aufgrund ihres Ausmaßes in Versuchsanlagen, deren Temperatur nicht konstant gehalten wird, prozentuale Veränderungen in der Zusammensetzung der polyphosphatspeichernden Bakterien überdecken. Dies gilt insbesondere für kommunale Kläranlagen bzw. Versuchsanlagen, die mit kommunalem Abwasser betrieben werden und somit eine geringere P-Freisetzung in der anaeroben Phase besitzen.

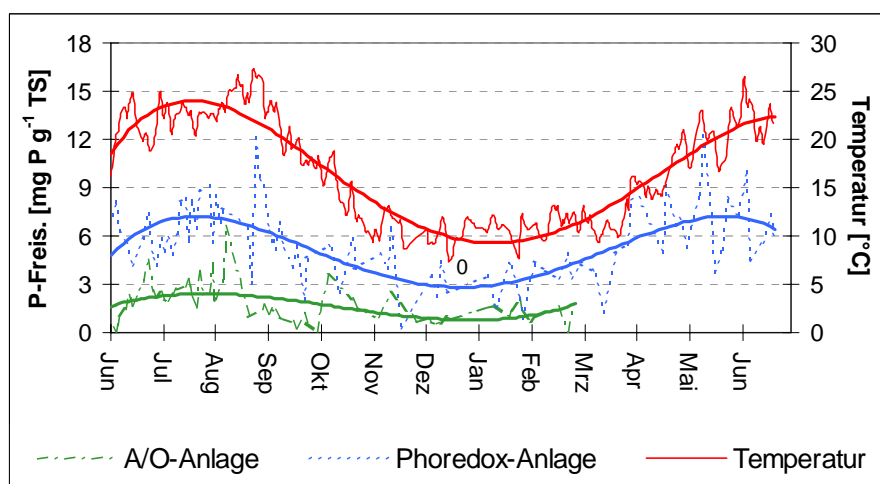


Abbildung 5.8: P-Freisetzung in Abhängigkeit zur Abwassertemperatur

5.2.3 Batchversuche zur Bestimmung der P-Freisetzungs- und P-Aufnahmeraten

Zur Bestätigung der in den Versuchsanlagen ermittelten Freisetzungsraten und zur Ermittlung des Freisetzungspotentials wurden Versuche zur P-Freisetzung und -Aufnahme durchgeführt. In Abbildung 5.9 ist zu erkennen, dass die Belebtschlämme der A/O- und der Phoredox-Anlage vergleichbare Freisetzungen bzw. -Aufnahmeraten besaßen. Bezogen auf die Trockenmasse wurde jedoch für den Belebtschlamm der Phoredox-Anlage mit ca. $12 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$ eine etwas höhere P-Freisetzung als für den Belebtschlamm der A/O-Anlage ($10 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$) ermittelt.

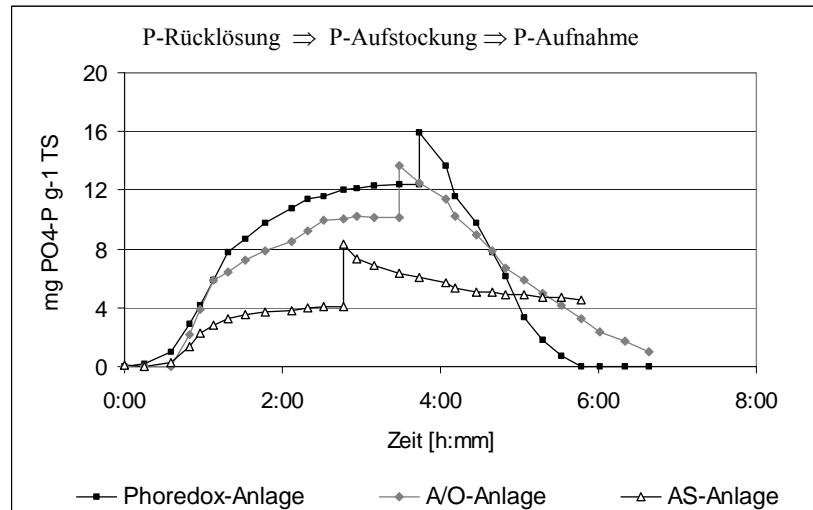


Abbildung 5.9: P-Freisetzung- und P-Aufnahme in den Batch-Versuchen

Die AS-Anlage zeigte im Batchversuch trotz der fehlenden anaeroben Stufe ebenfalls eine geringe P-Freisetzung, die im Bereich von ca. 4 mg $\text{PO}_4\text{-P g}^{-1}\text{ TS}$ lag. Dies bestätigt die beobachtete P-Freisetzung im Nachklärbecken aufgrund der anaeroben Verhältnisse. Eine erhöhte P-Elimination, d.h. eine zusätzliche P-Aufnahme nach der P-Aufstockung, konnte demgegenüber für diesen Belebtschlamm in den Batchversuchen nicht nachgewiesen werden.

Vergleichbare Freisetzungs- und Aufnahmeraten, d.h. im Bereich von 10 mg $\text{PO}_4\text{-P g}^{-1}\text{ TS}$, sind in der Literatur für Versuchsanlagen, die mit kommunalem Abwasser betrieben wurden (Tabelle 5.1), verzeichnet. Wie SCHÖNBORN (1998) zu entnehmen ist, sind die Freisetzungs- und Aufnahmeraten von der Art der Verfahrensführung und der Zusammensetzung des Abwassers abhängig. Die höchsten Raten wurden in SBR-Anlagen ermittelt, die mit künstlichem Abwasser betrieben wurden.

Tabelle 5.1: Vergleich der ermittelten Freisetzungs- und Aufnahmeraten mit Angaben aus der Literatur

Verfahren	A/O-Anlage	A/O-Laboranlage	Phoredox-Anlage	Phoredox-Verfahren
	diese Arbeit	SCHÖNBORN (1998)	diese Arbeit	BOLL (1998)
Freisetzungsrates [mg P g ⁻¹ TS]	nach 1 h: 6,6 Max.: 7,0	nach 1 h: 7,1-11,6 Max.: 7,1-11,6	nach 1 h: 9,4 Max.: 8,3	nach 1 h: 10,6 Max.: 10,6
Aufnahmerates [mg P g ⁻¹ TS]	nach 1 h: 4,6 Max.: 4,6	nach 1 h: 4,5-7,5 Max.: 4,5-7,5	nach 1 h: 8,0 Max.: 4,6	

5.2.4 P-Fraktionierung

Zusätzlich zu den Batchversuchen wurden P-Fraktionierungen nach PSENNER (UHLMANN et al., 1990; SCHÖNBORN, 1998) durchgeführt. Mit diesem Verfahren werden die unterschiedlichen Phosphorspezies mittels aufeinander folgender Extraktionsschritte isoliert und deren Konzentration bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse lassen sich Angaben zur P-Bindung im Belebtschlamm treffen, die zusätzliche Aussagen über eine erhöhte biologische P-Speicherung zulassen.

Bei der P-Fraktionierung nach PSENNER entspricht die NaOH-NRP-Fraktion dem organischen Zellphosphat einschließlich den Polyphosphaten. Daher ist der Anteil dieser Fraktion am Gesamtposphor des Belebtschlammes ein Maß für das biologisch gespeicherte Phosphat, während die Differenz zwischen dem aeroben und anaeroben Anteil ein Maß für das an der biologischen P-Elimination beteiligte Polyphosphat ist (SCHÖNBORN, 1998). In der BD-SRP- und der NaOH-SRP-Fraktion ist das Phosphat enthalten, welches an Eisen bzw. an Aluminium gebundenen ist.

In Abbildung 5.10 sind die Ergebnisse der P-Fraktionierungen der Belebtschlämme aus den Versuchsanlagen zusammengestellt. Der Gesamtposphorgehalt der untersuchten Belebtschlämme lag zwischen 21 und 28 mg P g⁻¹ TS. Der Anteil der NaOH-NRP-Fraktion variierte im aeroben Bereich zwischen 6,8 mg P g⁻¹ TS (AS-Anlage) und 11 bzw. 14 mg P g⁻¹ TS (A/O- bzw. Phoredox-Anlage). Im Anaeroben besaß der Belebtschlamm zwischen 7,6 P g⁻¹ TS (A/O-Anlage) bzw. 8,9 P g⁻¹ TS (Phoredox-Anlage). Der Anteil der NaOH-NRP-Fraktion der AS-Anlage im Aeroben entspricht somit dem der beiden EBPR-Anlagen nach einer P-Freisetzung im Anaeroben.

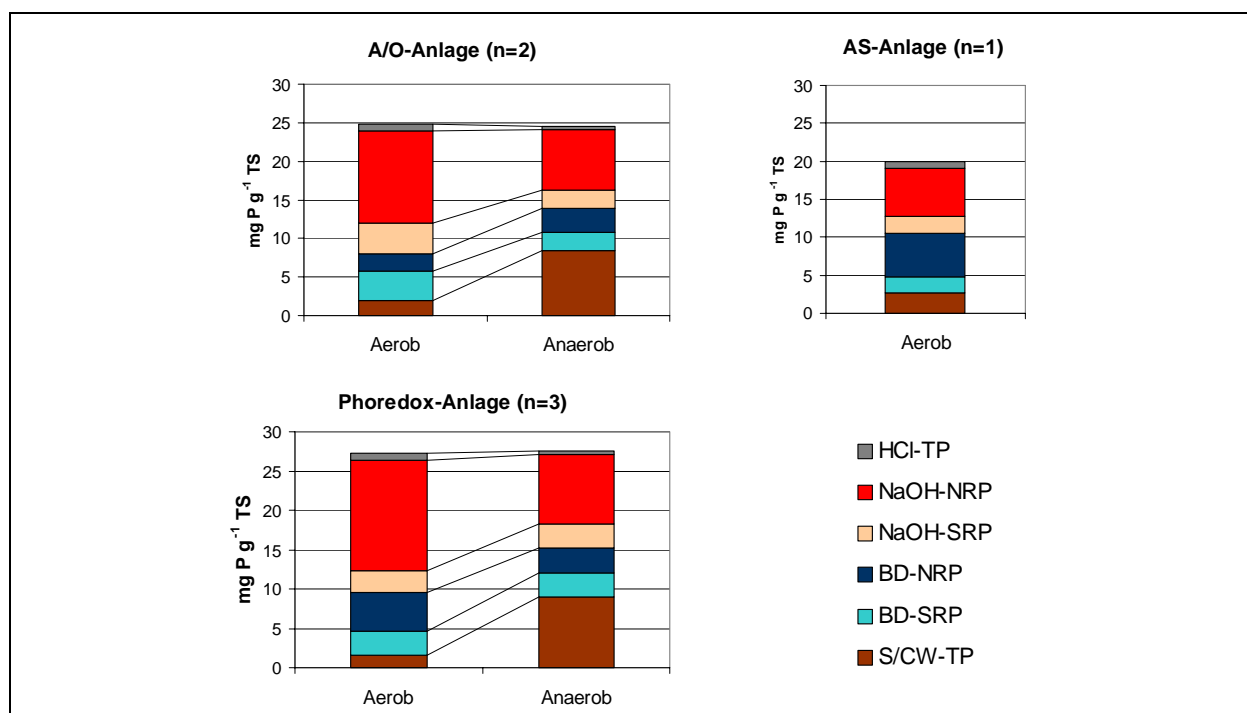


Abbildung 5.10: P-Fraktionierung der unterschiedlichen Belebtschlämme

Für die Anlagen mit einer erhöhten biologischen P-Speicherung, d.h. für die A/O- und die Phoredox-Anlage, konnte aufgrund der Differenz der NaOH-NRP-Fractionen zwischen dem aeroben und dem anaeroben Becken eine Freisetzung von 3,4 bzw. 5,1 mg P g⁻¹ TS ermittelt werden. Dies entspricht etwa der im Durchschnitt ermittelten P-Freisetzung im Anaerobbecken (Kap. 5.2.1). Für die Fraktionen, in denen die an Metallen (Al, Ca, Fe, Mg) gebundenen Phosphate extrahiert werden, wurden keine Unterschiede gemessen.

Da für die AS-Anlage nur Ergebnisse aus dem Betrieb unter aeroben Milieu vorliegen, sind keine Angaben über die Mobilität der NaOH-NRP-Fraktion möglich. Da diese Fraktion ca. 30% des Gesamtposphats entspricht, muss von einer erhöhten Phosphoraufnahme ausgegangen werden. Dies wird durch die chemischen Analysen aus den Batch-Versuchen bestätigt. Auf Grundlage der Batchversuche muss weiterhin davon ausgegangen werden, dass ca. 4 mg P g⁻¹ TS von den gemessenen 6,8 mg P g⁻¹ TS als mobiles Polyphosphat gespeichert sind. Die restlichen 2,7 mg P g⁻¹ TS (ca. 14%) entsprechen dem nicht mobilen organischen Zellphosphat.

5.3 Potentieller Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe an der Phosphat-Freisetzung

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Batch-Versuche zur Bestimmung der P-Freisetzung der untersuchten Belebtschlämme in Beziehung zur Abundanz der *Rhodocyclus*-Gruppe gesetzt werden. Diese Gegenüberstellung soll Hinweise dazu liefern, ob nur diese Bakteriengruppe für die gemessene P-Freisetzung verantwortlich ist oder ob noch weitere Organismen beteiligt sein müssen.

In den Batch-Versuchen wurde für die Belebtschlämme der beiden Versuchsanlagen eine maximale P-Freisetzung von 10-12 mg PO₄-P g⁻¹ TS ermittelt (5.2.3). Der Gesamtposphatgehalt lag bei 25 mg PO₄-P g⁻¹ TS.

Für einen Vergleich der berechneten P-Freisetzung mit Literaturangaben über die P-Gehalte von Reinkulturen muss die gemessene Freisetzung auf die organische Trockenmasse (oTS) bezogen werden, da der Belebtschlamm neben der Biomasse auch anorganische Stoffe, wie z.B. Tonmineralien, enthält. Dieser wird als Glühverlust bestimmt. Bei einem durchschnittlichen Glühverlust der Belebtschlämme von ca. 80%, bezogen auf die Trockenmasse, ergibt sich eine P-Freisetzung von 12-15 mg PO₄-P g⁻¹ oTS.

Da neben den Bakterien auch organischer Detritus sowie Proto- und Metazoen in der organischen Trockenmasse enthalten sind, wird bei dieser Berechnung die P-Freisetzung bezogen auf die Bakterienbiomasse deutlich unterschätzt.

Unter der Annahme, dass die *Rhodocyclus*-Gruppe allein für die erhöhte biologische Phosphatelimination in den Belebtschlämmen der beiden Versuchsanlagen verantwortlich ist, muss die berechnete P-Freisetzung auf den prozentualen Anteil dieser Gruppe an der Biozönose bezogen werden. Bei einem prozentualen Anteil von ca. 5%, ermittelt durch die *in situ* Analyse, ergibt sich somit eine spezifische P-Freisetzung von 250-300 mg PO₄-P g⁻¹ oTS (*Rhodocyclus*-Gruppe). Dies entspricht einem Anteil des gespeicherten Polyphosphat von ca. 25-30% an der organischen Trockenmasse unter aeroben Bedingungen.

Die Literaturangaben über den Gesamtphosphatgehalt von Reinkulturen, z.B. für *Acinetobacter* und *Pseudomonaden*, liegen bei 5-10% (SCHÖNBORN, 1998; WELTIN et al., 1996). Vergleichbare P-Gehalte (13-15%) ermittelten CROCETTI et al. (2000) für die Belebtschlämme ihrer SBR-Anlagen, die mit acetathaltigem Abwasser beschickt wurden. In diesen Anlagen dominierte die *Rhodocyclus*-Gruppe, die maßgeblich für die biologische Phosphatelimination dieser Systeme verantwortlich war, die Biomasse mit einem Anteil von >80%.

Im Vergleich zu der oben berechneten P-Freisetzung für die Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe liegen die Literaturangaben deutlich niedriger. Da es sich bei diesen Werten um Angaben zum Gesamtphosphat handelt, sind darin neben dem gespeicherten Polyphosphat auch das organisch gebundene Phosphat der Zellen enthalten.

Dieser deutliche Unterschied zwischen der berechneten P-Freisetzung durch die *Rhodocyclus*-Biomasse in den beiden Belebtschlämmen und den Literaturangaben zeigt, dass in den Versuchsanlagen nicht nur diese Bakteriengattung für die erhöhte biologische Phosphatelimination verantwortlich sein kann. Selbst in den SBR-Anlagen von CROCETTI et al. (2000), in denen die Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe durch hohe Acetatkonzentrationen selektiert wurden, wurden für die Biomasse deutlich niedrigere Gesamtphosphatkonzentrationen ermittelt.

Diese Aussage wird durch die eigenen fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen (5.5.1.4.2) und Literaturangaben (ZILLES et al., 2002) unterstützt, in denen nicht alle erkennbaren Polyphosphatgranula Zellen der *Rhodocyclus*-Gruppe zugeordnet werden konnten.

5.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Im Untersuchungszeitraum konnten für beide Versuchsanlagen mit $2,9 \cdot 10^9$ (A/O-Anlage) bzw. $3,2 \cdot 10^9$ Bakterien l^{-1} (Phoredox-Anlage) vergleichbare Gesamtzellzahlen ermittelt werden.

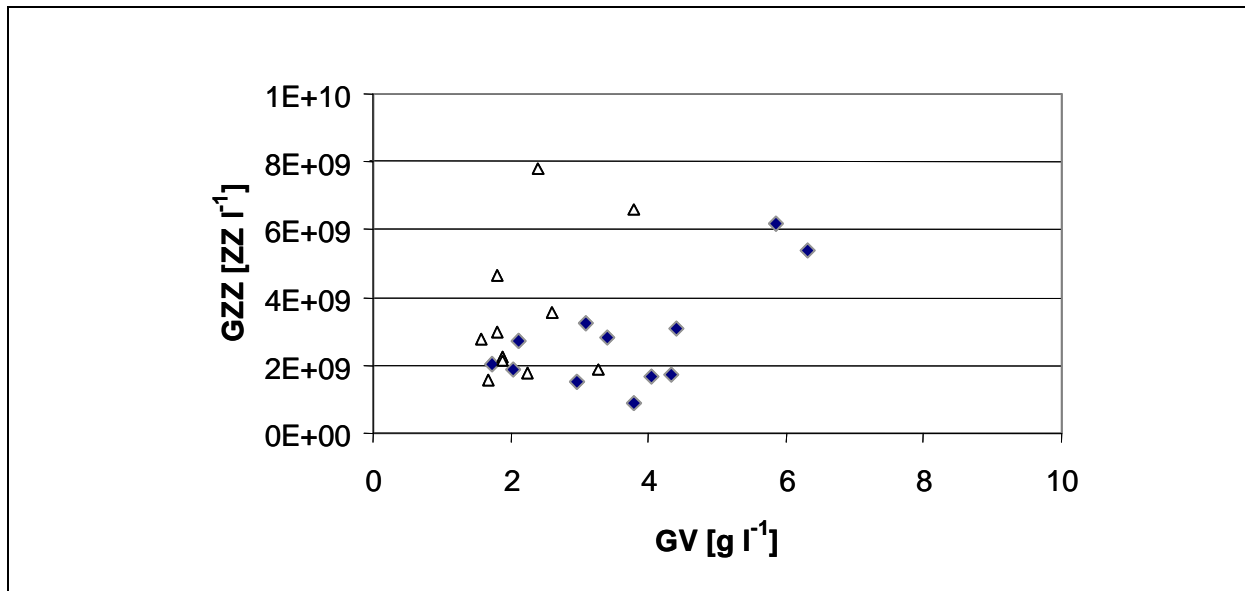


Abbildung 5.11: Beziehung zwischen Trockenmasse und Gesamtzellzahlen der beiden Versuchsanlagen (♦: A/O-Anlage; Δ: Phoredox-Anlage)

In Abbildung 5.11 wurden die Gesamtzellzahlen den berechneten Glühverlusten gegenübergestellt. Tendenziell scheinen die Bakterien der A/O-Anlage einen etwas größeren Glühverlust zu besitzen als die der Phoredox-Anlage. Aufgrund der großen Streuung der Werte ist jedoch eine genaue Aussage nicht möglich.

5.5 Mikrobielle Charakterisierung der Belebtschlämme

5.5.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Für einen Vergleich der Belebtschlämme der beiden Versuchsanlagen wurden über einen Zeitraum von 8 Monaten im Abstand von ca. 14 Tagen Proben entnommen und mit der universellen Sonde EUB338-I sowie gruppenspezifischen Sonden untersucht. Neben den spezifischen Sonden für die α -, β - und γ -Gruppe der Proteobakterien wurden Sonden für die GRAM-positiven Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt (HGC-Sonde) und für das Cytophaga-Flavobacterium-Cluster (CF-Sonde) in den Untersuchungen eingesetzt. Die Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Analyse mit gruppenspezifischen Sonden sind in Abbildung 5.13 dargestellt.

5.5.1.1 Eubakterien-Sonde (EUB338-I)

Mit der universellen Sonde EUB338-I konnten im Durchschnitt ca. 70-85% der mit DAPI gefärbten Bakterien hybridisiert werden. Ähnliche Prozentzahlen wurden schon von verschiedenen Autoren für vergleichbare Belebtschlammssysteme beschrieben (WAGNER et al., 1993; MANZ ET AL, 1994 ; WALLNER et al.; 1995; KÄMPFER et al.,1996; SNAIDR et al., 1997; MUDALY et al., 2001 u.v.a.). Obwohl eine direkte Korrelation zwischen Signalstärke und Stoffwechselaktivität nicht für alle Bakterien zutrifft (AMANN et al., 1995; DeLong et al., 1989), deutet der hohe Prozentsatz an hybridisierbaren Zellen auf einen hohen Anteil an stoffwechselaktiven Zellen in den Belebtschlämmen hin.

Der Anteil an nicht-hybridisierbaren Bakterien von ca. 20-30% der Gesamtzahl lässt sich wie folgt begründen:

- (1) Die Oligonukleotidsonde EUB338-I erfasst nicht alle phylogentischen Linien der Bakterien. So konnten NEEF et al. (1998) und DAIMS et al. (1998) u.a. zeigen, dass Vertreter der *Planctomycetales* nicht mit der Sonde EUB338-I hybridisieren. Um das Spektrum zu erweitern, entwickelten DAIMS et al. (1998) zwei weitere universelle Oligonukleotidsonden, EUB338-II und EUB338-III, die in Kombination mit der Sonde EUB338-I eingesetzt werden sollen. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass auf Grund der in Datenbanken stetig steigenden Anzahl an neuen Sequenzen bisher unbekannter Mikroorganismen weitere Bakterienspezies existieren, die auch von dieser Sondenkombination nicht erfasst werden.
- (2) Des Weiteren haben die Fixierung und Vorbehandlung der Proben einen großen Einfluss auf die Hybridisierbarkeit der Bakterienzellen (ZARDA et al., 1997). So gibt es eine Reihe von Bakteriengruppen, wie z.B. nocardioforme Actinomyceten oder GRAM-positive Kokken, die ohne eine enzymatische Vorbehandlung, wie z.B. mit Mutanolysin (SCHUPPLER et al., 1998) oder Lysozym (BEIMFOHR et al., 1993) keine oder nur sehr schwache Fluoreszenzsignale geben.
- (3) Schließlich muss davon ausgegangen werden, dass sich auch im Belebtschlamm nicht alle Bakterien in einem Zustand hoher physiologischer Aktivität befinden, der eine sichere Detektion mittels FISH zulässt (DELONG et al., 1989; WALLNER et al., 1993). Der Anteil an physiologisch aktiven Zellen wird in der Literatur aufgrund der unterschiedlichen Nachweisverfahren sehr kontrovers diskutiert.

Zudem konnte für beide Belebtschlämme eine deutliche negative Korrelation zwischen dem Anteil an hybridisierbaren Zellen und der Temperatur des Abwassers gezeigt werden (Abbildung 5.12). Diese Abnahme der Detektierbarkeit bei höheren Temperaturen kann durch die höhere Stoffwechselaktivität erklärt werden, wodurch die organischen Nährstoffe des Abwassers schneller abgebaut werden. Aufgrund des geringeren Nährstoffangebotes gelangen die Zellen schneller in die stationäre Phase, in der eine deutliche Reduktion der Signalintensität aufgrund des geringeren Ribosomengehaltes der Zellen auftritt. Diese erhöhte Stoffwechselaktivität der Bakterien ist auch eine der Ursachen für die deutliche Korrelation der P-Freisetzung mit der Temperatur (Kap. 5.2.2).

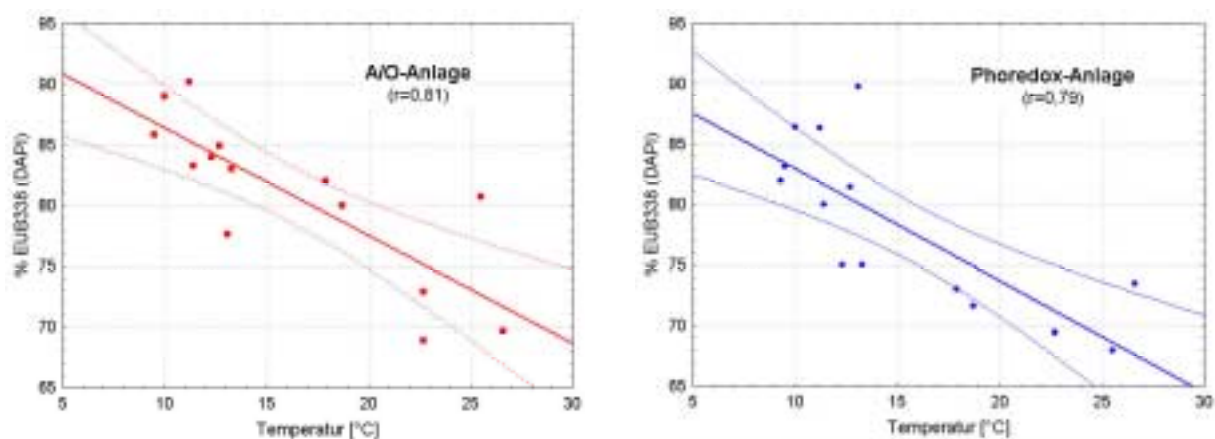


Abbildung 5.12 Abhängigkeit der Hybridisierbarkeit des Belebtschlammes mit der Sonde EUB338-I von der Temperatur (Die Regressionsbänder entsprechen einer Konfidenz von 0,95.)

5.5.1.2 Gruppenspezifische Sonden

Versuchsanlagen

Trotz unterschiedlicher Verfahrensführung besaßen die Belebtschlämme der beiden Versuchsanlagen auf Gruppenniveau eine sehr ähnliche bakterielle Zusammensetzung. Beide Anlagen wurden von Bakterien der β -Gruppe der Proteobakterien dominiert (ca. 21% \pm 6%). Die α -Proteobakterien, die HGC-Bakterien und das CF-Cluster besaßen mit ca. 12-16% ähnliche Abundanzen. Unter den untersuchten phylogenetischen Gruppen besaßen die γ -Proteobakterien den kleinsten prozentualen Anteil an der mikrobiellen Biozönose.

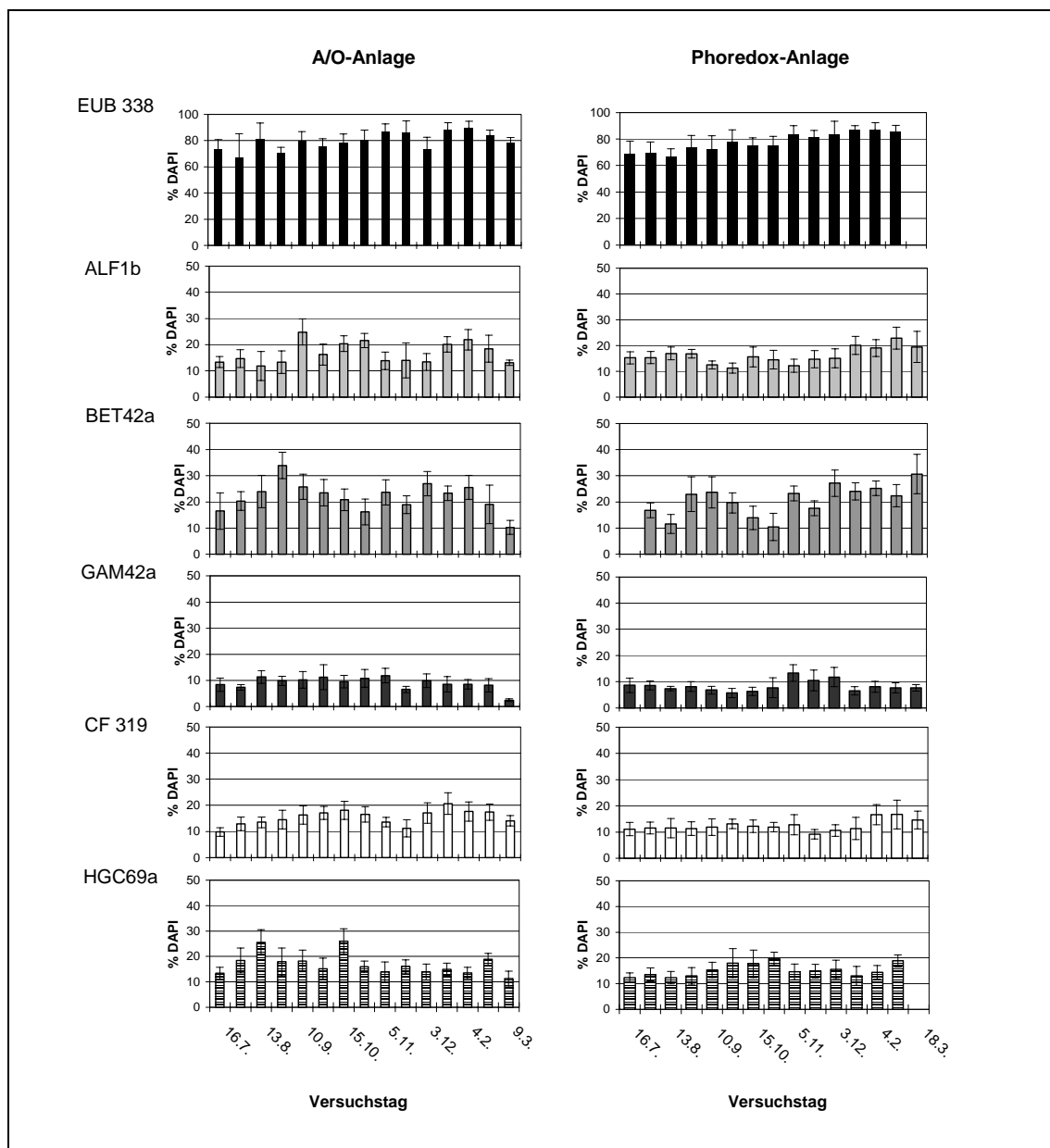


Abbildung 5.13 Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Analyse in den beiden Versuchsanlagen

Auffällig sind die z.T. starken zeitlichen Schwankungen innerhalb einzelner Gruppen, die in der A/O-Anlage etwas ausgeprägter auftreten als in der Phoredox-Anlage. Als Beispiele seien die Gruppe der β -Proteobakterien, der HGC-Bakterien und des CF-Clusters in der A/O-Anlage genannt.

Vergleich mit kommunalen Kläranlagen

Für eine bessere Beurteilung der Ergebnisse aus den Laboranlagen wurden Belebtschlammproben aus drei kommunalen Kläranlagen mit in die Untersuchungen aufgenommen. Die Kenndaten der Anlagen sind im Kapitel 4.2 näher erläutert.

Allgemein lässt sich anhand der Ergebnisse eine Abnahme des Anteils der β -Proteobakterien mit zunehmendem Schlammalter bei gleichzeitigem Anstieg der Abundanz der α -Proteobakterien erkennen.

Die mikrobielle Zusammensetzung der Belebtschlamm-biozöten der Kläranlagen Bad Liebenwerda und Elsterwerda unterscheidet sich auf Basis der gruppenspezifischen Sonden aufgrund einer Dominanz der α -Proteobakterien deutlich von denen der Versuchsanlagen und der KA Kaditz (Abbildung 5.14). Die sonst dominierenden β -Proteobakterien besitzen in diesen Anlagen nur eine Abundanz von ca. 12%. Zudem weisen beide Belebtschlämme mit ca. 75% eine eher niedrige Hybridisierbarkeit mit der Sonde EUB338-I auf.

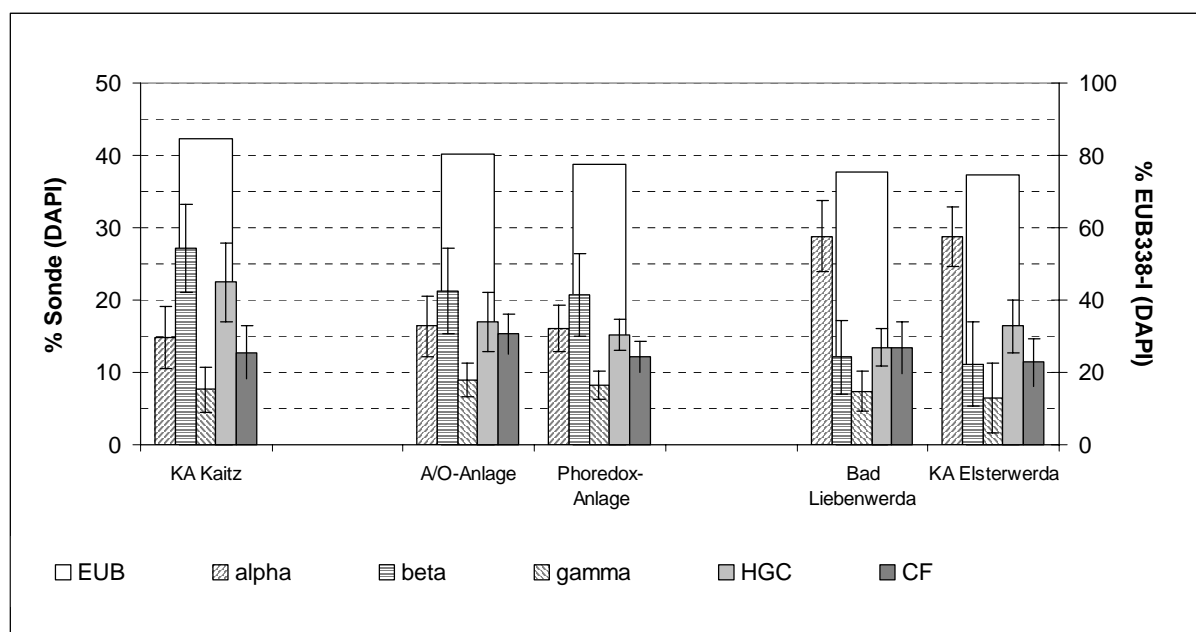


Abbildung 5.14: Mikrobielle Zusammensetzung der Belebtschlämme der Versuchsanlagen (n=15) im Vergleich zu den kommunalen Kläranlagen (n=2-3)

Die KA Bad Liebenwerda erhielt vor allem kommunales Abwasser mit einem hohen Gehalt an Ammonium, während das Abwasser der KA Elsterwerda zu ca. 60% aus Molkereiabwasser bestand. Da sich die beiden Kläranlagen in der Zusammensetzung ihres Abwassers stark unterscheiden, dürfte vor allem das extrem hohe Schlammalter (68 bzw. 80 Tage; vgl. Kap. 4.2.2 und 4.2.3) Ursache für diesen deutlichen Unterschied in der mikrobiellen Struktur der Biozöten im Vergleich zu den anderen Kläranlagen sein.

Da die beiden Versuchsanlagen, deren Biozöten sich deutlich von denen der beiden Kläranlagen unterschieden, mit ähnlichem Abwasser wie die KA Bad Liebenwerda beschickt wurden, kann die Ursache der andersartigen Populationsstruktur nicht nur in der Zusammensetzung des Abwassers liegen.

Die Biozöte der KA Kaditz besitzt auf Gruppenniveau eine ähnliche Zusammensetzung wie die der Versuchsanlagen. Sie zeichnet sich jedoch durch einen höheren Anteil an detektierbaren Bakterien (85%) und einem höheren prozentualen Anteil an β -Proteobakterien aus. Verfahrenstechnisch ist diese Kläranlage durch ein geringes Schlammalter (2 Tage), eine chemische Phosphatfällung und eine fehlende Nitrifikation/Denitrifikation charakterisiert.

Anhand der Abundanzen bei Anwendung der Sonde EUB338-I und der gruppenspezifischen Sonden wurde ein Baumdiagramm mit euklidischen Distanzen erstellt (Abbildung 5.15). Auch hier ist deutlich die Sonderstellung der beiden Kläranlagen mit hohem Schlammalter zu erkennen.

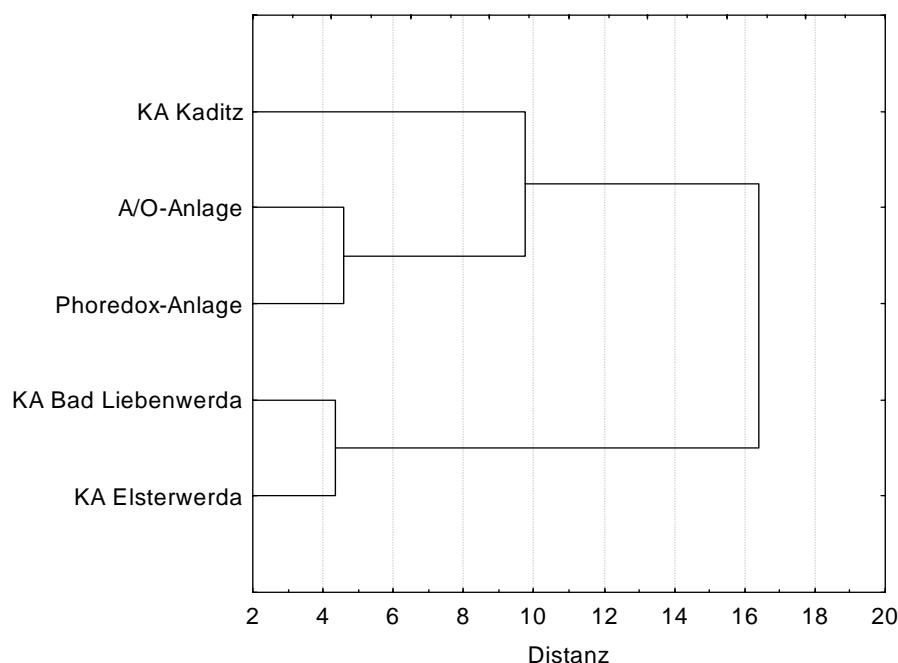


Abbildung 5.15: Clusteranalyse der untersuchten Versuchsanlagen und kommunalen Kläranlagen auf Basis der Fluoreszenz *in situ* Analyse mit gruppenspezifischen Sonden (Single Linkage, Eukl. Distanzen)

Vergleich mit Literaturangaben

Eine Dominanz der β -Proteobakterien, wie sie in den Versuchsanlagen und in der KA Kaditz gefunden wurde, ist schon für einige natürliche und anthropogene bzw. künstliche Habitate beschrieben worden, wie z.B. in ‚lake snow‘-Aggregaten (WEISS et al., 1998), in Biofilmen von Trinkwasserleitungen (KALMBACH et al., 1997), in Biofilmreaktoren zur Abwasserbehandlung (STOFFELS et al., 1998; WOBUS et al., 2000) und in Belebtschlammssystemen (SNAIDR et al., 1997; SUDIANA et al., 1998; WAGNER, 1994 und 1995). Jedoch traten in den untersuchten Systemen z.T. deutliche Unterschiede in den prozentualen Anteilen der untersuchten phylogenetischen Gruppen auf.

Es wurden aber auch Systeme beschrieben, wie z.B. Sedimente aus dem Wattenmeer oder Proben aus Bodenfiltern, in denen nicht β -Proteobakterien, sondern Bakterien des CF-Clusters (LLOBET-BROSSA et al., 1998) bzw. Vertreter der α -Proteobakterien oder der HGC-Gruppe (FRIEDRICH et al., 1999) dominierten.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der *in situ* Analyse der untersuchten Anlagen mit Literaturangaben für Belebtschlammssysteme verglichen werden (Tabelle 5.2). Bis auf die beiden Kläranlagen mit dem sehr hohen Schlammalter, Bad Liebenwerda und Elsterwerda, wurden alle bisher beprobten Anlagen, Laboranlagen sowie kommunale Anlagen, von der Gruppe der β -Proteobakterien (grau unterlegt) dominiert.

In den kommunalen Kläranlagen und den Laboranlagen mit kontinuierlicher Verfahrensführung besitzt die HGC-Gruppe, vergleichbar zu der A/O- und der Phoredox-Anlage, neben der Gruppe der α -Proteobakterien den zweitgrößten prozentualen Anteil. Jedoch zeigen die kommunalen Anlagen (WAGNER et al., 1994; KÄMPFER et al., 1996; SNAIDR et al. 1997) in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung auf Gruppenniveau eine höhere Ähnlichkeit zueinander als die kontinuierlich betriebenen Laboranlagen.

Im Vergleich zu den SBR, die mit künstlichem Abwasser betrieben wurden, zeigen die kommunalen Kläranlagen und die Laboranlagen mit kontinuierlicher Verfahrensweise eine höhere mikrobielle Diversität auf Gruppenniveau, da in ihnen mindestens vier der untersuchten phylogenetischen Gruppen einen Anteil von >10% besitzen. Dagegen dominiert in den meisten SBR die Gruppe der β -Proteobakterien mit bis zu 89%. Die anderen phylogenetischen Gruppen treten meistens nur sehr untergeordnet, d.h. mit einem Anteil <5%, auf (BOND et al., 1999 ; HESSELMANN et al., 1999).

Ähnlich verhält es sich auch in den Untersuchungen von CROCETTI et al. (2000), bei denen eine starke Dominanz der β -Proteobakterien (80%) nachgewiesen wurde. Jedoch ermittelten die Autoren für die anderen phylogenetischen Gruppen prozentuale Anteile zwischen 12 und 28%, so dass die Summe der prozentualen Anteile der einzelnen Gruppen 138% ergibt.

Tabelle 5.2: Literaturangaben über die mikrobielle Zusammensetzung von Belebtschlämmen

Anlage	Verfahren	Abwasser	Acetat-Dosierung	Anaerobe Phase	Schlamm-alter	Rücklauf-Schlamm	EUB	Proteobakterien			CFG	HGC	Autoren
			[mg l ⁻¹]	[h]	[Tage]	[%]	[%]	alpha-[%]	beta-[%]	gamma-[%]	[%]	[%]	
KA Bad Liebenwerda	EBPR	kom. Abw.	--	0,5	80		75	42	10	8	14	17	<i>diese Arbeit</i>
KA Elsterwerda	EBPR	kom. Abw.	--	3	68		74	44	12	6	12	10	<i>diese Arbeit</i>
KA Hirblingen	Phoredox	kom. Abw.	--	--	--		78	11 ¹⁾	24 ¹⁾	5 ¹⁾	9 ¹⁾	24 ¹⁾	WAGNER et al., 1994
KA Berlin-Ruhleben	EBPR	kom. Abw.	--	--	9,8		73	13	33	10	1	17	KÄMPFER et al., 1996
KA München-Großlappen	EBPR	kom. Abw.	--	--	--		81	8	41	12	12	13	SNAIDR et al., 1997
KA Hirblingen	Chem. F.	kom. Abw.	--	--	--		69	21 ¹⁾	53 ¹⁾	8 ¹⁾	5 ¹⁾	17 ¹⁾	WAGNER et al., 1994
KA Kaditz	Chem. F.	kom. Abw.	--	--	2		85	14	32	9	11	23	<i>diese Arbeit</i>
KA Amanzimtoti	kein BioP	kom. Abw.	--	--	--		74	11	25	14	9	13	MUDALY et al., 2001
Laboranlage	Cape Town	kom. Abw. ²⁾	--	ca. 1,7	21	?	87	2-7	16-39	2-15	2-6	1-7	LEE et al., 2002
Laboranlage	Phoredox	kom. Abw.	100	1,2	18	100	78	15	17	9	12	15	<i>diese Arbeit</i>
Laboranlage	Phoredox	kom. Abw.	--	2,7	10	100	79	19	22	17	11	8	MUDALY et al., 2002
Laboranlage	EBPR	künstl. Abw.	100	1	7	200-400	99	10	41	7	5	18	LIU et al., 2001
Laboranlage	A/O,-EBPR	kom. Abw.	100	0,8	4,4	100	80	15	20	7	13	18	<i>diese Arbeit</i>
Laboranlage	A/O, EBPR	kom. Abw. ²⁾	--	ca. 2	4	?	90	1-8	7-48	2-15	1-5	1-8	LEE et al., 2002
Laboranlage	kein BioP	kom. Abw.	100	0	2,4	100	79	13	30	8	11	10	<i>diese Arbeit</i>
Labor-SBR	EBPR	künstl. Abw.	850	2,5	8	--	78	4	45	< 1	n.d.	35	BOND et al., 1999
Labor-SBR	kein BioP	künstl. Abw.	700	2	6,7	--	63	< 1	58	< 1	n.d.	< 1	BOND et al., 1999
Labor-SBR A	EBPR	künstl. Abw.	400	2	7	--	88	3 ¹⁾	89 ¹⁾	2 ¹⁾	5 ¹⁾	1 ¹⁾	HESELNANN et al., 1999
Labor-SBR	EBPR	künstl. Abw.	309	2 (?)	7-8 (?)	--	--	12 ¹⁾	80 ¹⁾	1 ¹⁾	14 ¹⁾	28 ¹⁾	CROCETTI et al., 2000
Labor-SBR B	EBPR	künstl. Abw.	50	2	7	--	87	9 ¹⁾	34 ¹⁾	7 ¹⁾	16 ¹⁾	20 ¹⁾	HESELNANN et al., 1999

grau-unterlegt: dominierende Bakteriengruppen

¹⁾ Die prozentualen Angaben beziehen sich auf %EUB.

²⁾ Dem Abwasser wurde Acetat und Glukose in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Eine Ausnahme in der mikrobiellen Zusammensetzung bildet hier der Laborreaktor SBR B in den Untersuchungen von HESSELMANN et al. (1999), der im Gegensatz zum Laborreaktor SBR A eine mit den kommunalen Kläranlagen vergleichbare mikrobielle Struktur (Tabelle 5.2, außer KA Bad Liebenwerda und KA Elsterwerda) zeigte. Da sich die beiden Reaktoren jedoch nur in der Konzentration der Kohlenstoffquellen des zugeführten Abwassers (Das Abwasser des SBR A enthielt deutlich mehr Acetat und weniger Pepton und Hefeextrakt.) unterschieden, ist daraus ableitbar, dass die höhere Konzentration an Acetat zu einer Selektion der β -Proteobakterien geführt hat. Dies bestätigt die Ergebnisse von LEE et al. (2002), die in kontinuierlich betriebenen Anlagen durch eine Zudosierung von Acetat zu kommunalen Abwasser eine Zunahme der β -Proteobakterien induzieren konnten.

Da für die aufgeführten Zitate nicht alle verfahrenstechnischen Daten, wie z.B. die Zusammensetzung des Abwassers, das Schlammalter und die Schlammbelastung, vorliegen, sind weitere Aussagen über die Bedeutung der einzelnen Parameter für die mikrobielle Zusammensetzung der Belebtschlämme an dieser Stelle nicht möglich. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass sowohl die Zusammensetzung des Abwassers, künstliches oder kommunales Abwasser, als auch die Verfahrensführung einen großen Einfluss auf die mikrobielle Struktur der Belebtschlämme besitzen.

Aber auch die z.T. sehr geringen Volumina der Anlagen, die Temperatur und die Probenzahl könnten die Ergebnisse beeinflusst haben. So kann eine zu geringe Anzahl an analysierten Proben zu einer Fehlbewertung der mikrobiellen Zusammensetzung führen, da es innerhalb der Biozöten zu zeitlichen Veränderungen in den Abundanzen einzelner Gruppen kommen kann. Derartige Veränderungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die untersuchten Belebtschlämme nachgewiesen werden (Abbildung 5.13). In dem Untersuchungszeitraum von ca. 8 Monaten, in dem sich die Zusammensetzung des Abwassers nur im Rahmen der örtlichen Gegebenheiten veränderte, konnten in den analysierten Proben deutliche zeitliche Schwankungen der Abundanzen einzelner Gruppen nachgewiesen werden.

Besonders deutlich sind solche Veränderungen in der A/O-Anlage am Beispiel der β -Proteobakterien zu erkennen, für die im Untersuchungszeitraum bei einem Mittelwert von 20% Abundanzen zwischen 11,6% und 30,6% ermittelt wurden. Ähnliche Schwankungen des prozentualen Anteils, d.h. ca. 50% des Mittelwertes, wurden auch für das CF-Cluster und etwas weniger ausgeprägt für die HGC-Gruppe gefunden.

Eine Ursache für die stärkeren zeitlichen Veränderungen innerhalb der Biozöten der A/O-Anlage könnte das im Vergleich zur Phoredox-Anlage geringere Schlammalter sein, wodurch Veränderungen innerhalb der Biozöten aufgrund einer Veränderung der chemischen oder physikalischen Parameter, wie z.B. Temperatur, deutlicher hervortreten. Eine direkte Abhängigkeit dieser Veränderungen der prozentualen Abundanzen einzelner phylogenetischer Gruppen von chemischen und physikalischen Parametern konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Ähnliche Veränderungen in den prozentualen Anteilen einzelner Gruppen wurden auch von LEE et al. (2002) beobachtet. In dieser Studie wurden zwei kontinuierlich betriebene Versuchsanlagen zur biologischen P-Elimination über einen Zeitraum von 2,5 Jahren untersucht. Dabei handelte es sich um eine A/O- und eine Phoredox-Anlage, die jeweils mit kommunalem Abwasser betrieben wurden, dem unterschiedliche Acetat- und Glucose-Mengen zudosiert wurden. Die Abstände der Beprobungen lagen zwischen 1 und 6 Monaten. Auch in diesen Untersuchungen waren die größeren zeitlichen Schwankungen innerhalb der einzelnen Bakteriengruppen in der A/O-Anlage mit dem niedrigeren Schlammalter zu beobachten.

5.5.1.3 Einfluss der Temperatur auf die mikrobielle Zusammensetzung

Um einen Hinweis auf die von den zeitlichen Veränderungen betroffenen Bakteriengruppen zu erhalten, wurden zusätzlich spezifische Oligonukleotidsonden für zwei weitere Untergruppen der β -Proteobakterien eingesetzt. Dies waren die Oligonukleotidsonde NEU, mit Spezifität für halophile und halotolerante Vertreter der Gattung *Nitrosomonas*, und die Oligonukleotidsonde Sna23a, die spezifisch für fadenförmige Bakterien ist, und zwar für die Gattung *Sphaerotilus* und Verwandte. In Abbildung 5.16 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

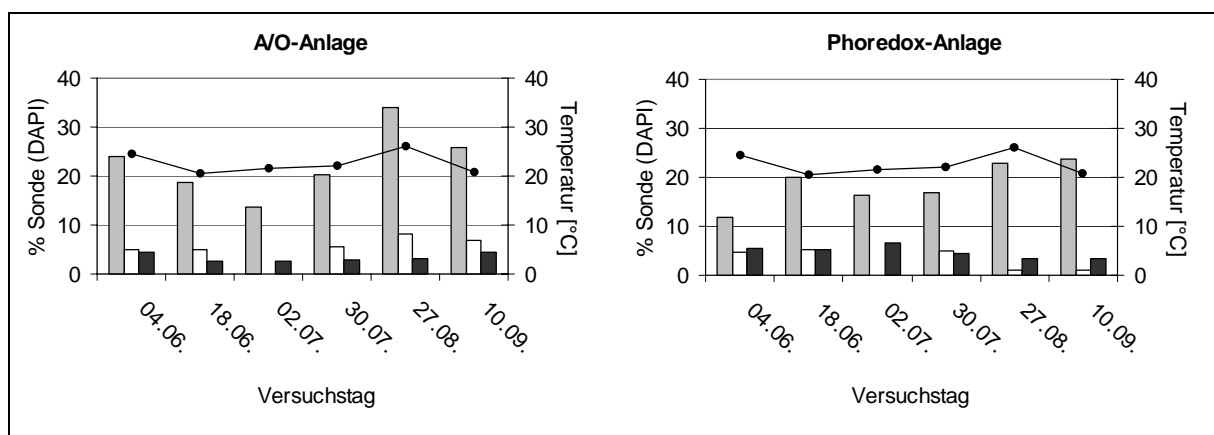


Abbildung 5.16: Vergleich der Abundanzen für die Gruppe der β -Proteobakterien sowie NEU- und Sna23a-positiver Bakterien an sechs Untersuchungstagen (■ Sonde Beta23a, □ Sonde Sna23a, ■ Sonde NEU, ● Temperatur)

Der Anteil der NEU-positiven Bakterien blieb über den Untersuchungszeitraum relativ konstant, so dass in keiner der beiden Anlagen die über den Zeitraum beobachteten Veränderungen innerhalb der β -Proteobakterien mit einer Schwankung des prozentualen Anteils des *Nitrosomonas europaea*-Clusters erklärt werden können.

Dagegen besitzt die Gruppe der Sna23a-positiven Bakterien, zu denen die fadenförmigen Bakteriengattungen *Sphaerotilus* und *Leptothrix* gehören, einen gewissen Einfluss auf die zeitlichen Veränderungen der Abundanz der β -Proteobakterien ($r = 0,3$).

Für die Abundanz der Sna23a-positiven Bakterien konnte in diesen Untersuchungen eine signifikante Abhängigkeit ($r = 0,64$) zur Temperatur gefunden werden. Dies bestätigt den schon erwähnten Einfluss der Temperatur auf die mikrobielle Zusammensetzung der Belebtschlamm-biozönose.

5.5.1.4 Polyphosphat speichernde Bakterien (PAO)

Für den Nachweis potentiell Polyphosphat speichernder Bakterien wurden im Rahmen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zwei Oligonukleotidsonden, Actino1011 und PAO846, eingesetzt. Die Sonde Actino1011 ist spezifisch für GRAM-positive Bakterien der Gattung *Tetrasphaera*. Die zweite Sonde, PAO846, ist dagegen spezifisch für einige Vertreter der GRAM-negativen Gattung *Rhodocyclus*. Zusätzlich wurde die Oligonukleotidsonde Aca23a (WAGNER et al., 1994) für den Nachweis der Gattung *Acinetobacter* verwendet.

5.5.1.4.1 Vertreter der Gattung *Tetrasphaera*

Die Oligonukleotidsonde Actino1011 wurde anhand von zwei Sequenzen (AF255629 [Klone Ebpr19] und AF255628 [Ebpr20]) entwickelt, die aus einem Belebtschlamm mit EBPR stammen und mit der Gattung *Tetrasphaera* assoziiert sind. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und einer Gegenfärbung mit DAPI konnte für die hybridisierten Bakterien eine Polyphosphatspeicherung nachgewiesen werden (LIU et al., 2001).

In den Belebtschlämmen der beiden Versuchsanlagen konnten mit der Sonde Actino1011 ca. 6% der Zellen hybridisiert werden. Dabei war der prozentuale Anteil dieser Bakterien in der A/O-Anlage mit 6,2% etwas höher als in der Phoredox-Anlage (5,5%, Abbildung 5.17). Bezogen auf die HGC-Gruppe entspricht dies einem Anteil von ca. 50%.

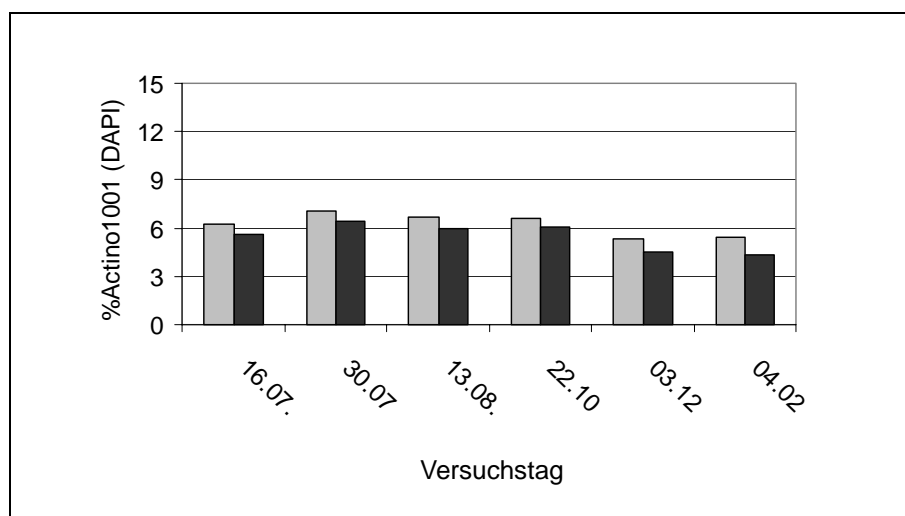


Abbildung 5.17: Prozentualer Anteil der mit der Sonde Actino1001 hybridisierten Bakterien an der Gesamtzellzahl (□ A/O-Anlage, ■ Phoredox-Anlage)

Auch in den Belebtschlammern der untersuchten kommunalen Kläranlagen konnten Bakterien mit der Oligonukleotidsonde Actino1011 detektiert werden. Dort wurden prozentuale Anteile zwischen 6,2% (KA Kaditz) und 8,9% (KA Elsterwerda) ermittelt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 5.18 zu entnehmen. Unterschiede im Anteil der Actino1011-positiven Bakterien konnten in Abhängigkeit von einer EBPR zwischen den Anlagen nicht gefunden werden. Eine Abhängigkeit der Abundanz der Actino1011-positiven Bakterien vom Schlammalter war ebenfalls nicht zu erkennen.

Literaturangaben über die Abundanz der Gattung *Tetrasphaera* in Belebtschlammssystemen liegen außer von LIU et al. (2001) nicht vor. Die Autoren untersuchten mit molekularbiologischen Methoden die mikrobielle Biozönose einer Laboranlage, die mit künstlichem Abwasser (100 mg Acetat l⁻¹) beschickt worden war. Im Belebtschlamm dieser Anlage konnten sie mit der Sonde Actino1011 ca. 17% der Zellen detektieren, dass entspricht einem Anteil von >90% der HGC-Gruppe. Gleichzeitig hybridisierten in diesem Belebtschlamm ca. 35% der Bakterien mit der Sonde PAO846 (Kapitel 5.5.1.4.2).

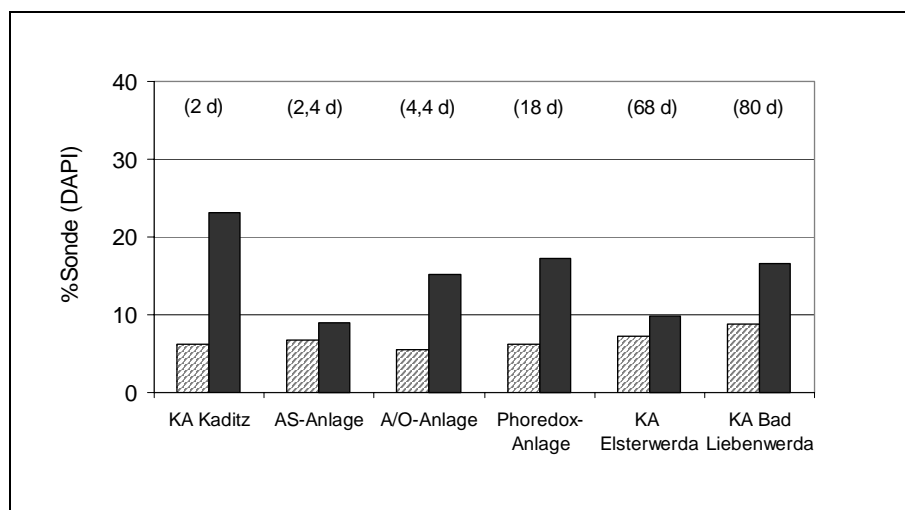


Abbildung 5.18: Anteil der Actino1011-positiven Bakterien im Belebtschlamm der untersuchten Anlagen ([d] Schlammalter der Anlage, ▨ Actino1011, ■ HGC69a).

Aufgrund der Ergebnisse der *in situ* Analyse in Kombination mit der DAPI-Färbung kann von einer Beteiligung dieser Bakteriengruppe an der erhöhten biologischen Phosphatelimination ausgegangen werden. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von LIU et al. (2001) konnte im Rahmen dieser Arbeit für einige Vertreter dieser Gruppe, die in größeren Clustern zusammengelagert waren, im mikroskopischen Bild eine Einlagerung von Polyphosphatgranula nachgewiesen werden (Abbildung 5.21).

Da in den Belebtschlammern der beprobten Versuchsanlagen nicht nur GRAM-positive Bakterien eine Einlagerung von Polyphosphatgranula zeigten, kann dieser phylogenetischen Gruppe nicht die gesamte EBPR-Leistung zugesprochen werden.

Wie Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe (vgl. nächstes Kapitel) konnten auch Actino1011-positive Bakterien in allen untersuchten Anlagen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass sich diese Bakterien unabhängig vom Abwasserbehandlungsverfahren im Belebtschlamm etablieren können. Eine Ausnahme scheinen hier SBR-Reaktoren zu sein, die mit künstlichem Abwasser betrieben werden, welches Acetat als hauptsächliche C-Quelle enthält. In Untersuchungen von HESSELMANN et al. (1999) und BOND et al. (1999) wurden für derartige Anlagen z.T. nur sehr kleine prozentuale Anteile (ca. 1%) für die übergeordnete HGC-Gruppe ermittelt.

5.5.1.4.2 Vertreter der Gattung *Rhodocyclus*

Für den Nachweis der Vertreter der Gattung *Rhodocyclus* wurde die Oligonukleotidsonde PAO846 eingesetzt. Sie ist spezifisch für ein Cluster von 16S rDNA-Klonen aus Belebtschlamm, die mit der Gattung *Rhodocyclus* assoziiert werden, für die ebenfalls *in situ* eine Polyphosphatspeicherung nachgewiesen wurde (HESSELMANN et al., 1999; CROCETTI et al., 2000; ONUKI et al., 2002).

Der Anteil dieser Bakterien betrug in den Belebtschlammern der beiden Versuchsanlagen im Durchschnitt 4,7% (Abbildung 5.19). Dies entspricht einem Anteil von ca. 22% an der Gruppe der β -Proteobakterien. Damit lag der Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe ca. 1-2% niedriger als der Anteil der Actino1011-positiven Bakterien.

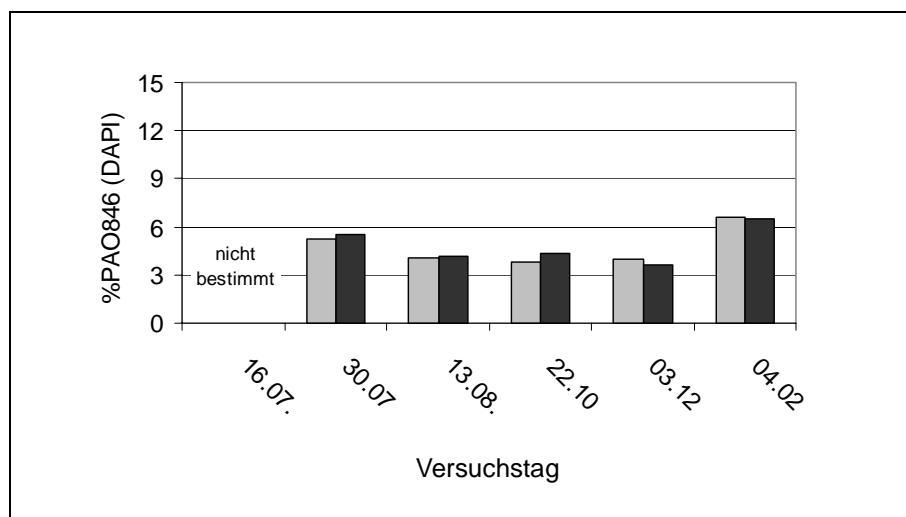


Abbildung 5.19: Anteil der mit der Sonde Pao846 hybridisierten Bakterien an der Gesamtzellzahl (□ A/O-Anlage, ■ Phoredox-Anlage)

Vergleicht man nun die Ergebnisse der beiden Versuchsanlagen mit denen der kommunalen Kläranlagen (Abbildung 5.20), so lässt sich ein Anstieg des Anteils der *Rhodocyclus*-Vertreter mit zunehmenden Schlammalter erkennen. Der Anteil dieser Gruppe lag zwischen 3,7% in der AS-Anlage und 6,9% in der KA Elsterwerda.

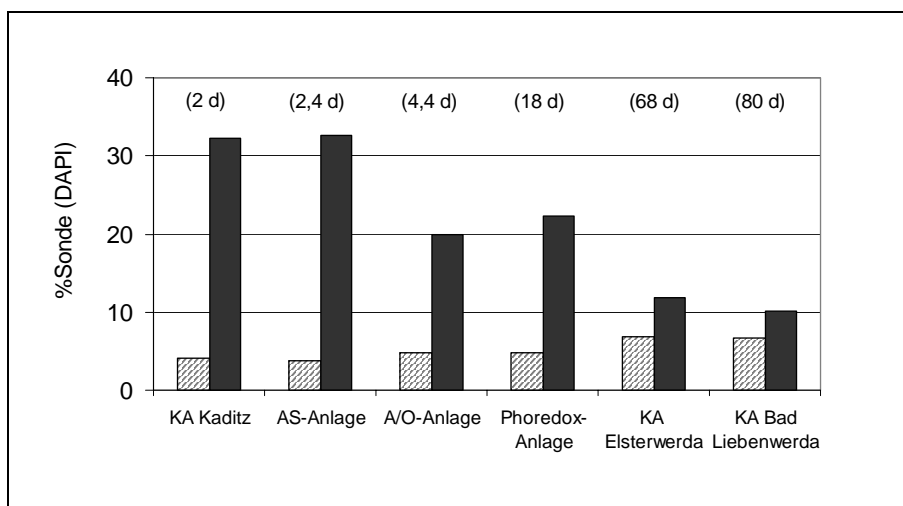


Abbildung 5.20: Anteil der PAO846-positiven Bakterien im Belebtschlamm der untersuchten Anlagen ([d] Schlammalter der Anlage, ▨ PAO846, ■ Beta23a)

Vergleichbar zu den Vertretern der Gattung *Tetrasphaera* (Kapitel 5.5.1.4.1) konnten Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe in Anlagen mit und ohne EBPR nachgewiesen werden. Jedoch lag der Anteil dieser Gruppe in den Anlagen mit EBPR im Vergleich zu Anlagen ohne EBPR deutlich höher (Abbildung 5.20). Zudem war in diesen Anlagen der Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe an der übergeordneten Gruppe der β -Proteobakterien mit ca. 60% am höchsten.

Vergleicht man die ermittelten Werte mit Literaturangaben (Tabelle 5.3), so liegen diese für die beiden Laboranlagen mit EBPR im Bereich der Untersuchungen von LEE et al. (2002). Diese Autoren betrieben zwei Versuchsanlagen mit kommunalem Abwasser, dem Acetat und Glukose zugesetzt wurde, und ermittelten für die *Rhodocyclus*-Gruppe einen prozentualen Anteil zwischen 4-28% (ca. 28-70% der β -Proteobakterien). In einem vergleichbaren Bereich liegen die Ergebnisse von ZILLES et al. (2002), die im Belebtschlamm zweier kommunaler Kläranlagen mit EBPR einen Anteil von 13-18% (ca. 65% der β -Proteobakterien) für die *Rhodocyclus*-Gruppe nachweisen konnten.

Dagegen wiesen LIU et al. (2001) in einer kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage, die mit künstlichem Abwasser betrieben wurde, für die *Rhodocyclus*-Gruppe einen Anteil von 35% nach. Dieser Anteil entspricht, bezogen auf die β -Proteobakterien, 85%.

Die höchsten Anteile der *Rhodocyclus*-Gruppe in Belebtschlamm-biozönosen konnten in SBR-Versuchsanlagen nachgewiesen werden, die mit künstlichem, acetathaltigem Abwasser beschickt wurden. So detektierten HESSELMANN et al. (1999) bei 400 mg Acetat l⁻¹ mit einer *Rhodocyclus*-spezifischen Oligonukleotidsonde ca. 80% der Bakterien, die mit der EUB-Sonde hybridisierten. Einen vergleichbar hohen Anteil konnten CROCETTI et al. (2000) in einem SBR-Reaktor nachweisen, der ebenfalls mit künstlichem, acetathaltigem Abwasser (850 mg Natriumacetat l⁻¹) betrieben wurde. In beiden Untersuchungen wurde eine Polyphosphat-speicherung beim größten Teil der detektierten Bakterien gefunden.

Tabelle 5.3: Vergleich der Ergebnisse mit Literaturangaben

Anlagentyp	Abwassertyp	Acetat-Konz.	Pao846-positive Bakterien	Anteil an den β -Proteob.	Autoren
SBR-Reaktor	künstl. Abw.	850 mg l ⁻¹	80%	< 90%	CROCETTI et al. (2000)
SBR-Reaktor	künstl. Abw.	400 mg l ⁻¹	ca. 80%	ca. 90%	HESSELMANN et al. (1999)
SBR-Reaktor	künstl. Abw.	50 mg l ⁻¹	ca. 23%	ca. 70%	HESSELMANN et al. (1999)
Labor-Anlage ¹⁾	künstl. Abw.	100 mg l ⁻¹	35%	85%	LIU et al. (2001)
Labor-Anlage ²⁾	kommunal. Abw.	4)	4-28%	35-70%	LEE et al. (2002)
Labor-Anlage ³⁾	kommunal. Abw.	4)	5-18%	28-46%	LEE et al. (2002)
WWT	kommunal. Abw.		18%	80%	ZILLES et al. (2002)
A/O-Anlage	kommunal. Abw.	100 mg l ⁻¹	3,8-6,6%	15-26%	diese Arbeit
Phoredox-Anlage	kommunal. Abw.	100 mg l ⁻¹	3,6-6,5%	13-36%	diese Arbeit

¹⁾ 17% Actino1001 (ca. 95% HGC)²⁾ Laboranlage mit EBPR³⁾ Laboranlage ohne EBPR⁴⁾ kommun. Abwasser mit Acetat- und Glukosezudosierung

Aufgrund der Literaturangaben kann davon ausgegangen werden, dass die Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe maßgeblich an der EBPR beteiligt sind. Zudem sind sie bisher die einzige Bakteriengruppe, für die im Belebtschlamm sowohl eine Polyphosphat- als auch PHB-Speicherung nachgewiesen wurde.

Aufgrund der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Anlagen, die durch Untersuchungen von ZILLES et al. (2002) gestützt werden, muss aber davon ausgegangen werden, dass nicht nur diese Bakterien-Gruppe für die erhöhte biologische Phosphat-Elimination verantwortlich ist.

So konnten in den eigenen Untersuchungen die extrem hohen prozentualen Anteile dieser Gruppen (bis 80%), die in Untersuchungen mit acetathaltigem Abwasser gefunden wurden, nicht bestätigt werden. Diese Selektion der Vertreter der *Rhodocyclus*-Gruppe wurde wahrscheinlich durch die z.T. sehr hohen Acetat-Konzentrationen (bis 850 mg Natriumacetat l⁻¹) im künstlichen Abwasser verursacht. Eine vergleichbare Selektion durch das verwendete Medium ist von WAGNER et al. (1994) für die Gattung *Acinetobacter* nachgewiesen wurden.

Vergleicht man zudem den Anteil der mit der Sonde PAO846 hybridisierten Bakterien an der Gruppe der β -Proteobakterien, so liegt dieser in den Anlagen, die mit acetathaltigem Abwasser beschickt wurden, sehr häufig über 80% (z.B. HESSELMANN et al., 1999). D.h. die dominierende Gruppe der β -Proteobakterien wird nahezu vollständig durch die Gattung *Rhodocyclus* vertreten. Da aber weitere Gattungen, wie z.B. *Nitrosomonas*, *Sphaerotilus*, *Burkholderia* und *Zoogloea*, die in Belebtschlammssystemen häufig nachgewiesen wurden, zu den β -Proteobakterien gehören, ist eine solche Dominanz in kommunalen Kläranlagen nicht zu erwarten.

Dies wird auch durch die Ergebnisse aus den Versuchsanlagen bestätigt, in denen die Bakterien, die mit der Oligonuklotidsonde PAO846 hybridisierten, nur ca. 30-50% der β -Proteobakterien ausmachten. Die Gattungen *Nitrosomonas* und *Sphaerotilus*, die im Rahmen dieser Untersuchungen auch mittels FISH untersucht wurden, besaßen jeweils einen Anteil von 2,3% an der Belebtschlammbiozönose. Dies entspricht einem Anteil von ca. 10% an der Gruppe der β -Proteobakterien.

Des Weiteren konnten bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht alle im Belebtschlamm detektierten Polyphosphatgranula-speichernden Bakterien dieser Gruppe zugeordnet werden (Abbildung 5.21). Einige Granula waren z.B., wie in den Untersuchungen von ZILLES et al. (2002), Zelleinschlüsse von GRAM-positiven Bakterien.

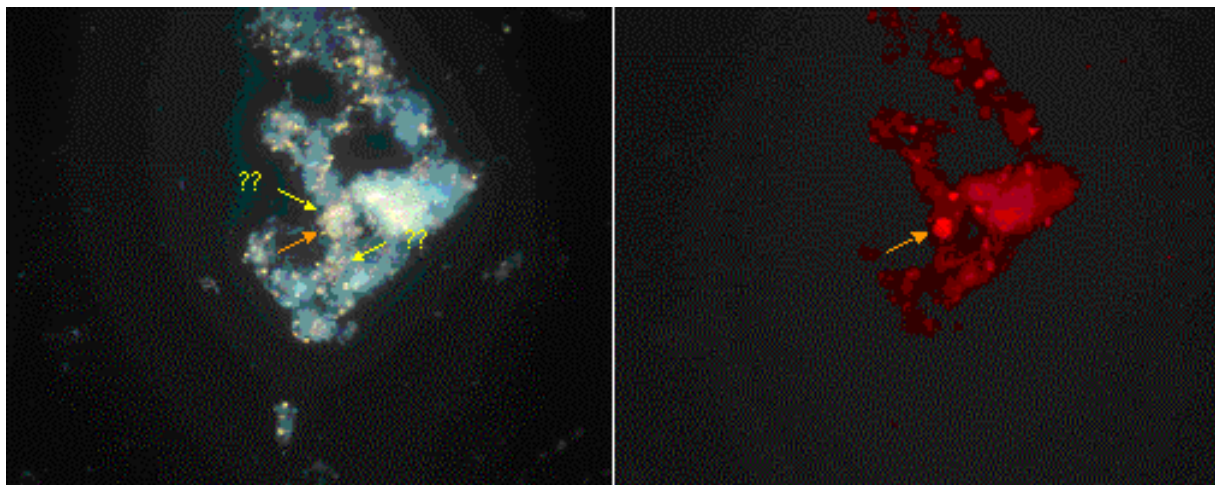


Abbildung 5.21: Fluoreszenzaufnahme einer Belebtschlammflocke der Phoredox-Anlage (rechts: DAPI-Färbung mit gelben Polyphosphatgranula; links: Cy3-markierte Sonde PAO846)

Da Vertreter dieser Gruppe in allen untersuchten Anlagen, d.h. auch im Belebtschlamm von Anlagen ohne EBPR (vgl. KA Kaditz) detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass sie zur „natürlichen“ mikrobiellen Flora von Belebtschlämmen gehören und aufgrund der Verfahrensführung der Bio-P-Anlagen ihre Physiologie ändern.

Für die Population der PAO bedeuten die ermittelten Werte, dass in Belebtschlammssystemen wahrscheinlich verschiedene Gattungen für die EBPR verantwortlich sind. Die Zusammensetzung der „PAO-Population“ wird möglicherweise durch die Beschaffenheit des Rohabwassers und das verwendete Verfahren beeinflusst.

5.5.1.4.3 Vertreter der Gattung *Acinetobacter*

Aufgrund der historischen Bedeutung der Gattung *Acinetobacter* für die Aufklärung der EBPR wurde mit der Sonde Aca23a zusätzlich zu den Sonden für potentielle PAO eine spezifische Sonde für die Gattung *Acinetobacter* eingesetzt.

Mit dieser Sonde konnten im Untersuchungszeitraum durchschnittlich ca. 2,5% (A/O-Anlage) bzw. ca. 2,1% (Phoredox-Anlage) der Zellen hybridisiert werden. Die Anteile der Gattung *Acinetobacter* variierten dabei in beiden Anlagen zwischen 1-4%. Bezieht man diesen Anteil auf die Gruppe der γ -Proteobakterien, so hybridisierten durchschnittlich 30-40% der Bakterien mit der Sonde Aca23a, wobei dieser Anteil sehr stark variierte (30-80%).

Der ermittelte Anteil von ca. 2,3% stimmt gut mit Literaturergebnissen überein. ERHART (1994), der die Abundanz der Gattung *Acinetobacter* in kommunalen Kläranlagen untersuchte, bestimmte in zwei Anlagen einen Anteil von 2-3% (KA Bamberg und KA Berlin-Ruhleben) während WAGNER et al. (1994) für die KA Hirblingen einen Anteil von ca. 5% beschrieben haben. Für Laboranlagen, die mit künstlichem oder aufgestocktem Abwasser beschickt wurden, ermittelten HESSELMANN et al. (1999) und MUDALY et al. (2001) Werte zwischen 1-9%.

Aufgrund der ermittelten geringen prozentualen Anteile für die Gattung *Acinetobacter* kann auch für die untersuchten Anlagen, Versuchsanlagen und kommunalen Kläranlagen, davon ausgegangen werden, dass diese Gattung keine dominante Rolle an der EBPR einnimmt. Da für Vertreter dieser Gattung eine Polyphosphatspeicherung nachgewiesen wurde, ist eine Beteiligung an der beobachteten EBPR aber nicht auszuschließen.

5.5.1.5 Ammonium oxidierende Bakterien

Voruntersuchungen

In Voruntersuchungen wurde anhand von einzelnen Belebtschlammproben geprüft, welche der in Kapitel 3.3 genannten Organismen im Probenmaterial dominieren. Hierfür wurden verschiedene spezifische Sonden für die Ammonium- und Nitrit-oxidierenden Bakterien (Kapitel 4.8.5) eingesetzt.

Mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde innerhalb der Gruppe der Ammonium oxidierenden Bakterien (AOB) eine Dominanz der Vertreter des *Nitrosomonas europaeae*/*Nitrococcus mobilis*-Clusters nachgewiesen. Die überwiegende Zahl der Zellaggregate, die mit der Sonde Beta23a hybridisierten, konnten mittels der Oligonukleotidsonden NEU und Nso1225 diesem Cluster zugeordnet werden (Abbildung 5.22).

Die Vertreter des *N. europaeae/N. mobilis*-Clusters sind typisch für Anlagen zur Abwasserreinigung und wurden auch häufig aus diesen isoliert (KOOPS et al., 1991). Die Abundanzen der einzelnen Vertreter der AOB in den unterschiedlichen Habitaten lassen sich zum Teil anhand der unterschiedlichen Affinitäten zu Ammonium und Sauerstoff erklären, die an Reinkulturen in Chemostaten ermittelt wurden (GIESEKE et al., 2001). Dabei besaßen Vertreter des *N. europaeae/N. mobilis*-Clusters geringere Affinitäten zum Substrat (NH_4^+ und NH_3) als *N. oligotropha*. Zudem ist von einer höheren Sauerstoffaffinität bei *N. oligotropha* auszugehen (GIESEKE et al., 2001). Aufgrund der hohen Ammonium- und Sauerstoffkonzentrationen in der Belebung kommt es zu einer Selektion von Vertretern des *N. europaeae/N. mobilis*-clusters gegenüber von *N. oligotropha*. Bei den Nitritoxidierern konnte die Gattung *Nitrospira* mit der Oligonukleotidsonde Ntsp 1026 nachgewiesen werden, wohingegen keine Zellen mit den Sonden NIT1-NIT3 hybridisierten.

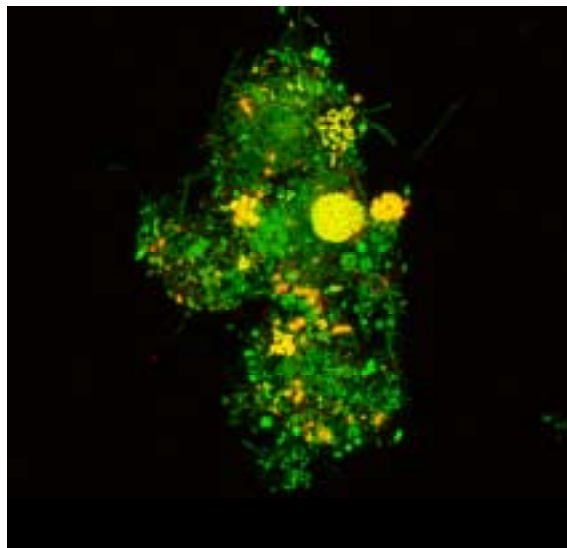


Abbildung 5.22: CLSM-Aufnahme einer Belebtschlammflocke (Phoredox-Anlage) nach einer Doppelhybridisierung mit den Sonden EUB338 I (FITC) und Nso1225 (Cy3)

Quantitative Untersuchungen mittels FISH

Aufgrund der unterschiedlichen Verfahrensführung, d.h. mit und ohne Nitrifikation, in den beiden Versuchsanlagen wurde von einem deutlichen Unterschied in Bezug auf die Abundanz der Ammonium oxidierenden Bakterien ausgegangen. Dementsprechend wurden in der Phoredox-Anlage ca. 80% des Gesamtstickstoffs eliminiert, in der A/O-Anlage nur ca. 20%. Eine Reduktion des Ammoniaks um 20-30% wird im Allgemeinen durch eine mikrobielle Assimilation durch die Biomasse (Anabolismus) erklärt.

Auf der Grundlage der Voruntersuchungen wurde für den Vergleich der Anlagen die Sonde NEU, die spezifisch für das *N. europaeae/N. mobilis*-Cluster ist, zur routinemäßigen Analyse der Belebtschlammproben eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 5.23 dargestellt. Es soll an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, dass die ermittelten Werte aufgrund der Clusterbildung dieser Organismengruppe keine quantitativen Aussagen zulassen.

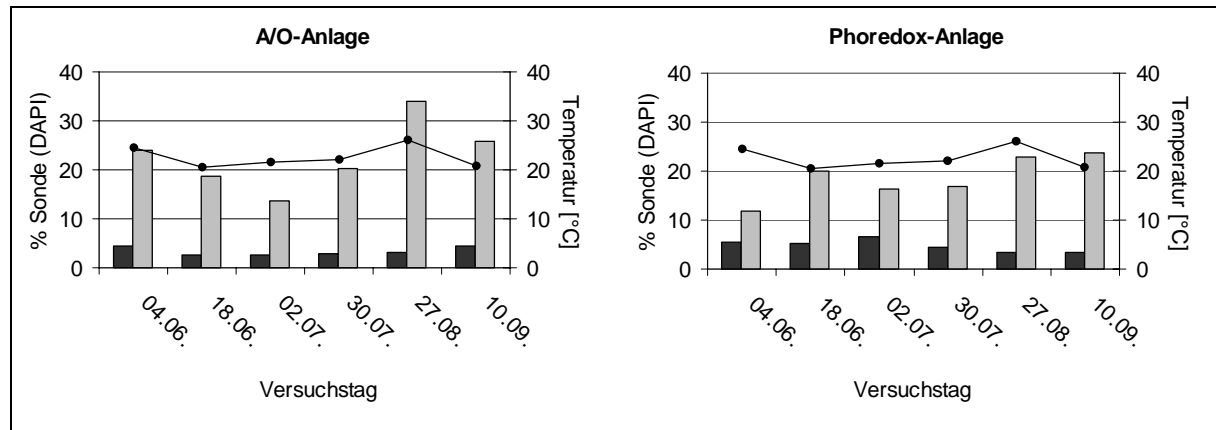


Abbildung 5.23: Abundanz der Bakterien, die mit der Sonde NEU hybridisieren, im Belebtschlamm der beiden Versuchsanlagen (■ Sonde Beta23a, ■ Sonde NEU, ● Temperatur)

Es konnten in beiden Anlagen über den gesamten Zeitraum Bakterien mit der Sonde NEU nachgewiesen werden. In der A/O-Anlage lag der Anteil dieser Gruppe bei durchschnittlich 3,4% der GZZ. Derartig hohe Werte waren nicht zu erwarten gewesen, da diese Anlage, wie bereits beschrieben, durch das niedrige Schlammalter und die hohe Schlammbelastung nicht für eine biologische Nitrifikation ausgelegt war. Für die Etablierung einer stabilen Nitrifikation wird ein Schlammalter von ca. 10-14 Tagen vorausgesetzt. In der Phoredox-Anlage wurden dagegen über den gesamten Zeitraum deutlich höhere Abundanzen (Mittelwert: 4,8% der GZZ) der NEU-positiven Bakterien ermittelt. Eine Korrelation zwischen der Abundanz der β -Proteobakterien und der Abundanz der NEU-positiven Bakterien konnte für beide Anlagen nicht nachgewiesen werden.

Angaben aus vergleichbaren Versuchs- bzw. kommunalen Anlagen sind aus der Literatur nicht verfügbar. Die Ergebnisse aus anderen Untersuchungsobjekten liegen mit 10-27% deutlich höher als die in den Versuchsanlagen ermittelten Zahlen. So fanden NODA et al. (2000) durch Anwendung spezifischer Antikörper einen Anteil der AOB von ca. 10% in einer Anlage zur Behandlung von Deponie-Sickerwasser. Deutlich höhere Anteile (13-20%) fanden WAGNER et al. (1995) und JURETSCHKO et al (1998) in Belebtschlämmen, die aus einer industriellen Anlage zur Behandlung von Abwasser einer Tierkörperbeseitigungsanlage ($\text{NH}_4\text{-N-Zulaufkonzentration ca. } 758 \text{ mg l}^{-1}$) stammten. Die höchsten prozentualen Anteile (ca. 27%) wurden von SCHMID et al. (2000) mittels FISH in einem nitrifizierenden Biofilmreaktor mit sehr hohen Ammoniumkonzentrationen im Zulauf ermittelt.

Ein Vergleich der Ergebnisse ist aufgrund der unterschiedlichen Verfahrensführung und Zusammensetzung des Rohabwassers nur zum Teil möglich. Durch die deutlich geringere Stickstoffbelastung und das höhere C:N-Verhältnis im kommunalen Abwasser sind niedrigere Abundanzen für AOB im Vergleich zu reinen Nitrifikationsanlagen zu erwarten.

5.5.1.6 Das Phylum *Planctomycetes*

Die Gruppe der *Planctomycetes* wurde zusätzlich in die Untersuchungen aufgenommen, da sie nicht mit der universellen Oligonukleotidsonde EUB338-I detektiert wird (ZARDA et al., 1997; DAIMS et al., 1999), aber eine bedeutende Rolle bei der anaeroben Ammoniumoxidation (Anammox; STROUS et al., 1999; JETTEN et al., 1998 und 2002) spielt.

Diese Mikroorganismen bilden eine separate Zweig innerhalb der Bakterien (WOESE, 1987) und zeichnen sich durch das Fehlen von Peptidoglycan in ihren Zellwänden aus (BALOWS et al., 1992; GRIEPENBURG et al., 1999). Vertreter dieses Phylums wurden in verschiedenen aquatischen und terrestrischen Habitaten (ZARDA et al., 1997; NEEF et al., 1998) nachgewiesen und sind als Morphotyp vor allem aus der Freiwasserregion von Seen seit langem bekannt. Zu Anfang waren von dieser Ordnung aerobe, GRAM-negative, chemoheterotrophe Bakterien bekannt, die eine kokkoide bis kurzstäbchenförmige Morphologie aufwiesen (STROUS et al., 1999). Die Anammox-Bakterien, die ebenfalls zu dieser Ordnung gehören, sind dagegen lithoautotroph.

In Belebtschlämmen wurden die *Planctomycetes* bereits durch verschiedene Autoren (BOND et al., 1995; NEEF et al., 1998; DAIMS et al., 1999) mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidsonden nachgewiesen bzw. in 16S rRNA-Genbibliotheken dokumentiert.

Auch in den untersuchten Laboranlagen konnten Vertreter dieser Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotid-Sonde Pla46a detektiert werden. Der prozentuale Anteil lag in der A/O-Anlage mit ca. 6% etwas höher als in der Phoredox-Anlage (4,2%). Der etwas höhere Anteil der *Planctomycetes* in der A/O-Anlage sollte allerdings in Hinblick auf den geringen Datensatz (n=4) und die hohen Standardabweichungen aufgrund der geringen Abundanzen nicht überbewertet werden. Zum Teil könnten jedoch die höheren Abundanzen in der A/O-Anlage durch die höhere Schlammbelastung bedingt sein. Hierdurch sind niedrigere Sauerstoffkonzentrationen innerhalb der Belebtschlammflocken möglich, die zu einer Selektion der lithoautotrophen Anammox-Bakterien führen könnten. Da diese Bakterien in Kultur meist eine lange Verdopplungszeit, z.B. 11 Tage für *Candidatus „Brocadia Anammoxidans“* (JETTEN et al., 2002), aufweisen, ist das Schlammalter in dieser Anlage für eine Etablierung der *Planctomycetes* eigentlich zu niedrig.

Literaturangaben über die Abundanz von *Planctomycetes* in Belebtschlämmen liegen auf einem vergleichbaren Niveau. So konnten NEEF et al. (1998) in allen untersuchten Kläranlagen Bakterien dieses Phylums unter Verwendung einer spezifischen Oligonukleotidsonde nachweisen. Der ermittelte Anteil war jedoch mit 0,1-5% in den einzelnen Kläranlagen sehr unterschiedlich.

Ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich lagen die Ergebnisse von LEE et al. (2002). Diese Autoren untersuchten über einen längeren Zeitraum die mikrobielle Zusammensetzung der Belebtschlämme zweier Versuchsanlagen (A/O- und Cape Town-Verfahren), die mit modifiziertem kommunalem Abwasser betrieben wurden. Mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnten sie Vertreter der *Planctomycetes* mit einer Abundanz zwischen 0,2-3% nachweisen. Dabei traten die höheren Abundanzen in der Anlage mit dem höheren Schlammalter auf, die nach dem Cape Town-Verfahren betrieben wurde. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine biologische Stickstoffeliminierung ohne parallele Phosphatelimination.

5.5.1.7 Grüne Schwefelfreie Bakterien (*Green non sulfur bacteria*)

Da die erstellten 16S rRNA-Genbibliotheken einige Sequenzen der Ordnung der *green non sulfur bacteria* (GNSB) enthielten, wurde auch diese Ordnung in die Fluoreszenz *in situ* Analyse miteinbezogen.

Darüber hinaus konnte mittels molekularbiologischer Techniken für einige fadenförmige Bakterien aus Belebtschlammssystemen, die bisher auf Grundlage des Bestimmungsschlüssels von EIKELBOOM & BUIJSEN (1983) unterschiedlichen Morphotypen zugeordnet wurden, die Zugehörigkeit zur *Chloroflexus*-Gruppe und somit zum Phylum *Green non sulfur bacteria* nachgewiesen werden.

So konnten KOHNO et al. (2002) mittels 16S rDNA-Analyse zeigen, dass einige Isolate des Typs 1851 zur *Chloroflexus*-Gruppe innerhalb der *Green non sulfur bacteria* gehören. Ebenso wiesen SCHADE et al. (2002) für einige „*Nostocoida limicola*“ ähnliche Organismen, die aus Belebtschlämmen isoliert wurden, eine Zugehörigkeit zu dieser Ordnung nach.

Mit Hilfe der Phylum-spezifischen Sonde GNSB941 konnten durchschnittlich in der A/O-Anlage 3,7% und in der Phoredox-Anlage 4,9% der Bakterien hybridisiert werden. Dieser relativ hohe Anteil an detektierten Bakterien in den Belebtschlämmen der Versuchsanlagen stimmt gut mit den Ergebnissen von BJÖRNSSON et al. (2002) überein, die unterschiedliche Kläranlagen in Australien untersuchten. Vor allem in Anlagen mit einer Stickstoffelimination konnten fadenförmige Bakterien der *Chloroflexus*-Gruppe häufig nachgewiesen werden.

Die *in situ* bestimmten, ähnlich hohen prozentualen Anteile für die *green non sulfur bacteria* widersprechen den deutlichen Unterschieden, die in den 16S rRNA-Genbibliotheken der beiden Anlagen beobachtet wurden (Kapitel 5.5.4.1). Des Weiteren lassen die hier gefundenen Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Schwimmschlamm (Kapitel 5.5.7.1) und der Abundanz der GNSB in den beiden Versuchsanlagen wahrscheinlich erscheinen. Aufgrund der zu geringen Anzahl an analysierten Proben (n=4) können allerdings keine genaueren Aussagen getroffen werden.

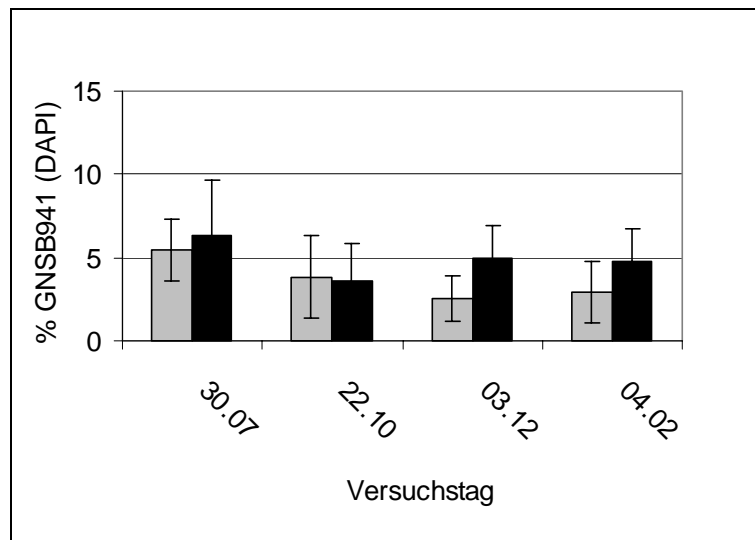


Abbildung 5.24: Anteil der mit der Sonde GNSB941 hybridisierten Bakterien an der Gesamtzellzahl (□ A/O-Anlage, ■ Phoredox-Anlage)

5.5.2 Universelle und amoA-spezifische PCR

Da die vergleichende 16S rDNA-Analyse wichtige Sequenzinformation zur Identifizierung von Bakterien liefert, wurde neben der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung im Rahmen dieser Arbeit auch diese Technik zur weitergehenden Charakterisierung der Belebtschlammbiozönosen eingesetzt. Hierzu wurde aus allen Proben des Versuchszeitraumes die Gesamt-DNA extrahiert und mittels PCR ein ca. 1350 bp großes 16S rDNA-Fragment amplifiziert. Die Proben vom 30.07. wurden ausgewählt, um für beide Versuchsanlagen je eine 16S rRNA-Genbibliothek erstellen.

Um weitere Informationen über die mikrobielle Diversität der Belebtschlammbiozönosen und mögliche zeitliche Veränderungen zu erhalten (Kapitel 5.5.1.2), wurden zusätzlich an Proben von drei Versuchstagen T-RFLP-Analysen durchgeführt.

Ausserdem wurde zur Charakterisierung der Ammonium oxidierenden Bakteriengemeinschaften eine weitere, für das amoA-Gen spezifische PCR durchgeführt. Das amoA-Gen kodiert für die α -Untereinheit der Ammoniakoxigenase, welche den ersten Schritt der Ammoniumoxidation katalysiert.

5.5.3 T-RFLP-Analyse

Als Fingerprint-Methode, zur weiteren mikrobiellen Differenzierung der untersuchten Anlagen, kam die T-RFLP-Analyse (Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus) zur Anwendung. Als Primersystem wurden die Primer TPU1, hier mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAMTM markiert, und 1387r eingesetzt.

Im Folgenden werden zuerst die T-RFLP-Ergebnisse der beiden Versuchsanlagen verglichen, da diese in der *in situ* Analyse eine sehr ähnliche mikrobielle Zusammensetzung auf Gruppenniveau aufwiesen. Zudem repräsentierten die für diese Anlagen erstellten 16S rRNA-Genbibliotheken eine vergleichbare Anzahl an Sequenzen. Anschließend erfolgte ein Vergleich mit den Ergebnissen der T-RFLP-Analyse der kommunalen Kläranlagen.

Für die charakteristischen Peaks der T-RFLP-Profile nach einem Verdau mit dem Enzym *MspI* wurden mit Hilfe der TORAST-Software Bakteriengattungen gesucht, die die entsprechenden Fragmentlängen besitzen (Tabelle 5.4). Die *RsaI*-Fragmentlängen der identifizierten Bakteriengattungen wurden dann mit den *RsaI*-Profilen verglichen.

5.5.3.1 Versuchsanlagen

Für den Nachweis von Veränderungen in den Fragmentprofilen der A/O-Anlage im Untersuchungszeitraum werden zunächst die Ergebnisse der T-RFLP-Analysen dieser Anlage an den drei Versuchstagen miteinander verglichen und die Abundanzen einzelner Peaks diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse mit denen der Phoredox-Anlage verglichen.

Der Abbildung 5.25 sind die Ergebnisse der Restriktionsanalyse für die A/O-Anlage mit dem Enzym *MspI* zu entnehmen. Die drei Profile entsprechen den Versuchstagen 30.07. (1), 27.08. (2) und 03.12. (3). An diesen Tagen wurden mittels der FISH deutliche Unterschiede in den prozentualen Anteilen der β -Proteobakterien an der Biozönose festgestellt (vgl. Kapitel 5.5.1.2). In den Elektropherogrammen der T-RFLP-Analysen der Proben der A/O-Anlage sind übereinstimmend mit der *in situ* Analyse ebenfalls Unterschiede zwischen den Versuchstagen zu erkennen.

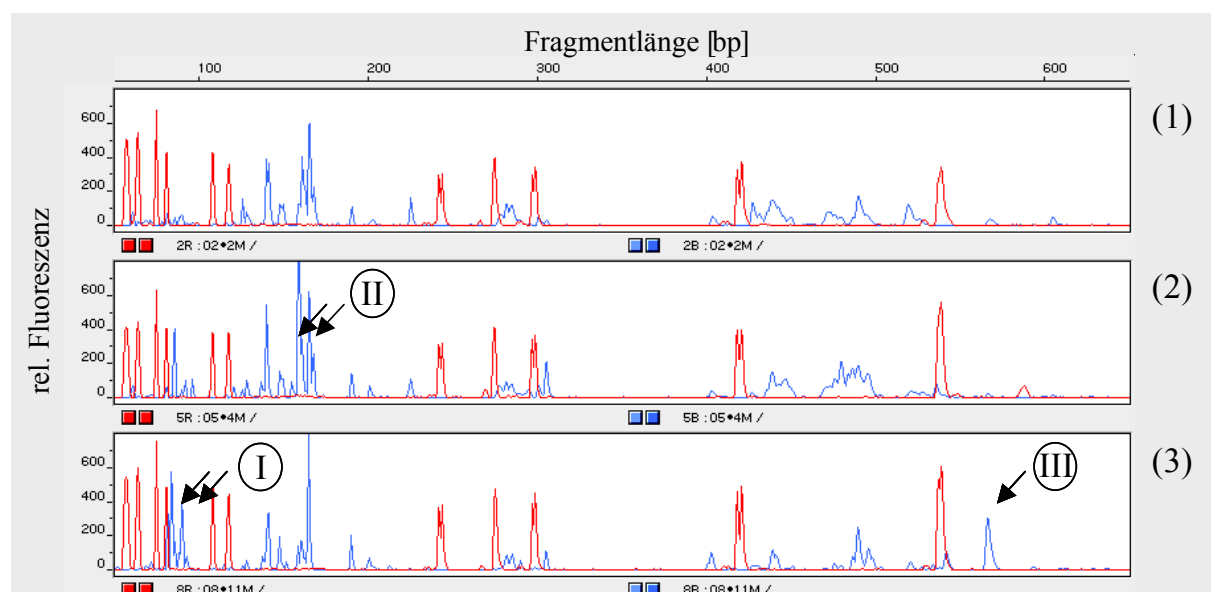


Abbildung 5.25: Restriktionsprofile der Proben aus der A/O-Anlage mit dem Enzym *MspI* zu den Versuchszeiten (1) 30.07., (2) 27.08. und (3) 03.12. (rot: interner Standard; Pfeile I-III: charakteristische Fragmente)

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der dominierenden Fragmentlängen in den Restriktionsanalysen mit dem Enzym *MspI* und den dazugehörigen Organismen ^{*)}

Fragmentlänge [bp]	Dominierende phylog. Gruppe	Gattungen
65	LGC, HGC	<i>Bacillus</i> (LGC), <i>Bifidobacterium</i> (HGC)
81-82	Proteobakterien	<i>Azoarcus</i> (β), <i>Nitrosococcus</i> (β), <i>Nitrosomonas</i> (β), <i>Leptothrix</i> (β), <i>Cytophaga</i> (CFG), <i>Streptococcus</i> (LGC), <i>Planctomycetales</i>
84-85	Proteobakterien CFG	<i>Azoarcus</i> (β), <i>Nitrosococcus</i> (β), <i>Nitrosomonas</i> (β), <i>Burkholderia</i> (β), <i>Cytophaga</i> (CFG), <i>Flexibacter</i> (CFG), <i>Bacteroidetes</i> (CFG)
89-91	Proteobakterien CFG	<i>Alcaligenes</i> (β), <i>Aeromonas</i> (γ), <i>Shewanella</i> (γ), <i>Cytophaga</i> (CFG), <i>Flavobacterium</i> (CFG), <i>Prevotella</i> (CFG), <i>Bacteroides</i> (CFG), <i>Enterococcus</i> (LGC)
115-116		Vertreter der β-Proteobakterien und der CF-Guppe, <i>Planctomycetes</i>
139-140	LGC, HGC	<i>Burkholderia</i> (β), <i>Bacillus</i> (LGC), <i>Clostridium</i> (LGC), <i>Desulfotomaculum</i> (LGC), <i>Paenibacillus</i> (LGC), <i>Nocardioide</i> (HGC), <i>Rhodococcus</i> (HGC), <i>Streptomyces</i> (HGC)
147-149		<i>Rhodobacter</i> (α), <i>Thiobacillus</i> (β), <i>Pseudomonas</i> (γ), <i>Bacteroidetes</i> (CFG), <i>Aerococcus</i> (LGC), <i>Bacillus</i> (LGC), <i>Paenibacillus</i> (LGC), <i>Staphylococcus</i> (LGC), <i>Arthrobacter</i> (HGC)
158-161	LGC, HGC	<i>Azospirillum</i> (α), <i>Clostridium</i> (LGC), <i>Desulfotomaculum</i> (LGC), <i>Staphylococcus</i> (LGC), <i>Arthrobacter</i> (HGC), <i>Corynebacterium</i> (HGC), <i>Friedmanniella</i> (HGC), <i>Mycobacterium</i> (HGC), <i>Nocardia</i> (HGC), <i>Rhodococcus</i> (HGC), <i>Streptomyces</i> (HGC)
163-165	HGC	<i>Bradyrhizobium</i> (α), <i>Desulfovibrio</i> (δ), <i>Arthrobacter</i> (HGC), <i>Brevibacterium</i> (HGC), <i>Gordonia</i> (HGC), <i>Micrococcus</i> (HGC), <i>Nostocoida</i> (HGC), <i>Propionibacterium</i> (HGC), <i>Rhodococcus</i> (HGC), <i>Tetrasphaera</i> (HGC), <i>Planctomycetes</i>
427	Proteobakterien	<i>Burkholderia</i> (β), <i>Dechloromonas</i> (β), <i>Helicobacter</i> (ε)
439-441	α-Proteobakterien	<i>Paracoccus</i> (α), <i>Azospirillum</i> (α), <i>Rhodobacter</i> (α), <i>Amaricoccus</i> (α), <i>Aquaspirillum</i> (β), <i>Rhodopseudomonas</i> (α)
446-447	Proteobakterien	<i>Rhodobacter</i> (α), <i>Achromobacter</i> (β), <i>Alcaligenes</i> (β), <i>Helicobacter</i> (ε)
469-471		<i>Campylobacter</i> (ε), <i>Acinetobacter</i> (γ), <i>Bacteroides</i>
493	Proteobakterien	<i>Dechlorosoma</i> (β), <i>Nitrosomonas</i> (β), <i>Pseudomonas</i> (β), <i>Rhodoferrax</i> (β), <i>Beggiatoa</i> (γ), <i>Erwinia</i> (γ), <i>Escherichia</i> (γ), <i>Cytophaga</i> (CFG), <i>Flexibacter</i> (CFG)
527	LGC	<i>Clostridium</i> (LGC), <i>Halobacteroides</i> (LGC)
565-566	HGC	<i>Enterococcus</i> (LGC), <i>Lactobacillus</i> (LGC)

() Zugehörige phylogenetische Gruppe : α-, β-, γ-, δ- und ε-Proteobakterien; GRAM-positive-Bakterien mit einem hohen (HGC) und niedrigen (LGC) GC-Gehalt der DNA

^{*)} Nach Abgleich der *RsaI*-Fragmentlängen

Die mittels T-RFLP gefundenen Unterschiede beruhen in der Hauptsache auf Veränderung der Höhe bzw. Fläche einzelner Peaks. Besonders deutlich ist dies für die Fragmentlängen 85, 90 (Pfeil I), 160, 165 (Pfeil II), 427 und 447 bp sowie im Bereich zwischen 470-500 bp zu erkennen (Abbildung 5.25). Aussagen über das Auftreten zusätzlicher Peaks, d.h. neuer Fragmentlängen, sind aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der Restriktion der einzelnen PCR-Ansätze schwierig. So muss davon ausgegangen werden, dass sehr kleine Peaks aufgrund des Hintergrunds in den Elektropherogrammen nicht sichtbar werden, wie z.B. die Peaks für die Fragmentlängen 230 und 566 bp (Pfeil III). Im Folgenden sollen anhand von vier Beispielen die beobachteten Veränderungen der Abundanzen einzelner Peaks dargestellt und Organismen vorgestellt werden, die entsprechende Fragmentlängen aufweisen.

So wurde mit fortlaufender Versuchsdauer eine deutliche Zunahme der Fragmentlängen 82 bp und 84 bp beobachtet (Pfeil I). Diese Fragmente sind charakteristisch für die Gattungen *Azoarcus*, *Nitrosomonas* und *Streptococcus* sowie für Vertreter der Cytophaga-Flavobacterium-Gruppe und der *Planctomycetes* (Tabelle 5.4). Sequenzen dieser Gattungen waren mit Ausnahme der Gattung *Nitrosomonas* ebenfalls in der erstellten 16S rRNA-Genbibliothek repräsentiert.

Eine weitere deutliche Veränderung der mikrobiellen Biozönose war anhand der Fragmentlängen 159 bp und 165 bp zu erkennen. So dominierte am 27.08. der Peak für die Fragmentlänge 159 bp deutlich gegenüber der Fragmentlänge 165 bp (Pfeil II). Diese beiden Fragmentlängen sind charakteristisch für GRAM-positive Bakterien, die auch die 16S rRNA-Genbibliothek der A/O-Anlage dominierten. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Gattungen *Clostridium*, *Nostocoida*, *Nocardioides* und *Tetrasphaera* zu nennen (Tabelle 5.4).

Ein weiteres Beispiel für eine beobachtete zeitliche Veränderung ist der Peak für die Fragmentlänge von 566 bp im T-RFLP-Profilen vom 03.12. (Pfeil III). Diese mittels *MspI* generierte Fragmentgröße ist charakteristisch für Vertreter der Gattungen *Enterococcus* und *Lactococcus*, die zu den GRAM-positiven Bakterien mit einem niedrigen GC-Gehalt der DNA gehören. Da auch in der 16S rRNA-Genbibliothek der A/O-Anlage vom 30.07. keine entsprechenden Sequenzen repräsentiert waren, korreliert das Fehlen des entsprechenden Peaks in diesem T-RFLP-Profilen gut mit den Ergebnissen der vergleichenden 16S rDNA-Analyse.

Vergleicht man die Elektropherogramme der beiden Versuchsanlagen (A/O- und Phoredox-Anlage), so ist die geringere Intensität der Fluoreszenz der Proben aus der Phoredox-Anlage deutlich sichtbar (Abbildung 5.26). Ursache hierfür könnte sowohl eine geringere DNA-Konzentration als auch eine geringere Effizienz der enzymatischen Restriktion der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte sein.

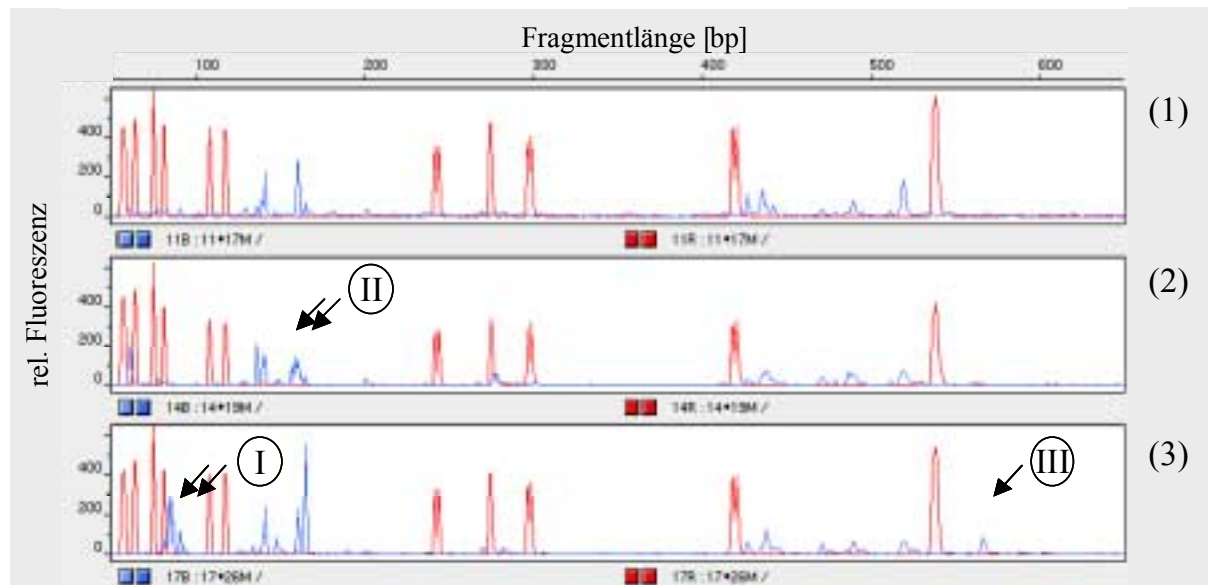


Abbildung 5.26: Restriktionsprofile der Proben aus der Phoredox-Anlage mit dem Enzym *MspI* zu den Versuchszeiten (1) 30.07., (2) 27.08. und (3) 03.12. (rot: interner Standard; Pfeile I-III: charakteristische Fragmente)

Weiterhin ist zu erkennen, dass die mikrobielle Zusammensetzung des Belebtschlammes der beiden Anlagen sehr ähnlich ist. In beiden T-RFLP-Profilen dominieren die Peaks für die Fragmentlängen 82-84 bp und 159-165 bp. Auch die zeitlichen Veränderungen, wie z.B. die Zunahme der Fragmentlängen 82-85 bp, sind für die Phoredox-Anlage erkennbar.

Diese hohe Übereinstimmung der T-RFLP-Ergebnisse war aufgrund der geringen Sequenzübereinstimmungen der beiden 16S rRNA-Genbibliotheken nicht zu erwarten. So waren nur 11 der insgesamt 84 repräsentierten Sequenzen in beiden 16S rRNA-Genbibliotheken vertreten.

5.5.3.2 Kommunale Kläranlagen

Trotz der ähnlichen mikrobiellen Zusammensetzung des Belebtschlammes der KA Kaditz im Vergleich zu dem der Versuchsanlagen (Kapitel 5.5.1) waren in den Ergebnissen der T-RFLP-Analyse deutliche Unterschiede zu erkennen. So dominierten nicht die Peaks für die Fragmentlängen 159 bp und 165 bp, sondern der Peak für 149 bp (Abbildung 5.27 B). Diese Fragmentlänge ist für mehrere taxonomische Gruppen charakteristisch (Tabelle 5.4). Zu ihnen gehören beispielsweise auch die Gattungen *Pseudomonas* und *Rhodobacter*, die ebenfalls in der 16S rRNA-Genbibliothek dieser Anlage mit 1 bzw. 6 Sequenzen vertreten waren.

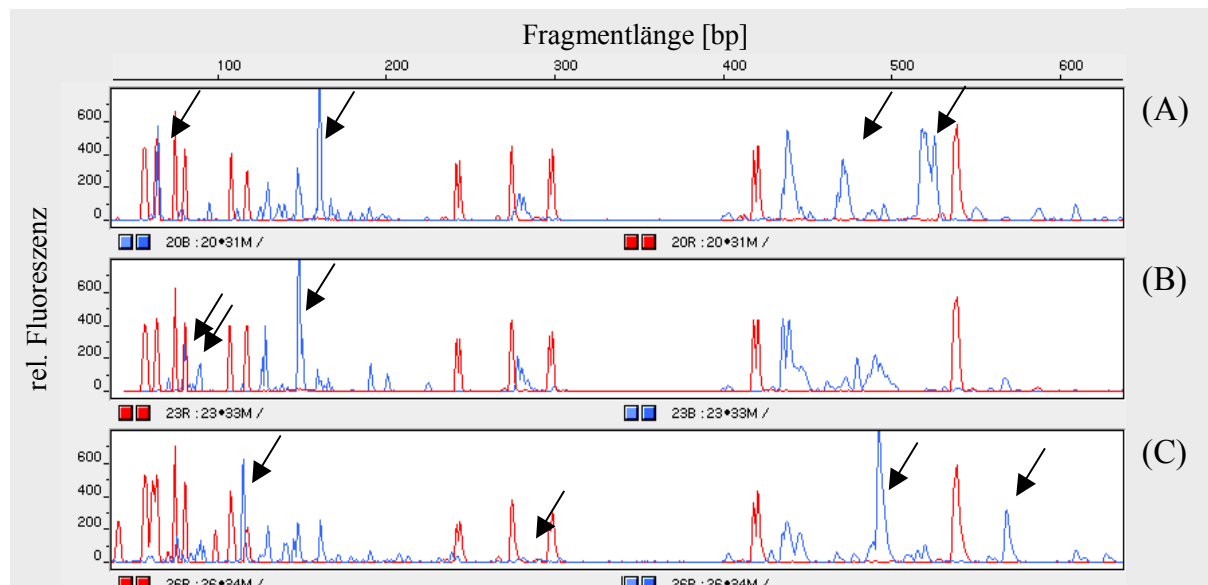


Abbildung 5.27 Restriktionsprofile der Proben aus den kommunalen Kläranlagen mit dem Enzym MspI. (A) KA Bad Liebenwerda, (B) KA Kaditz und (C) KA Elsterwerda (rot: interner Standard)

Für die beiden anderen kommunalen Kläranlagen, KA Bad Liebenwerda und KA Elsterwerda, konnten ebenfalls charakteristische Peaks in den T-RFLP-Profilen gefunden werden. So wird das Profil der KA Bad Liebenwerda durch Fragmente der Längen 64 bp, 160 bp, 470 bp und 520 bp dominiert (Abbildung 5.27 A). Diese treten auch in den Restriktionsprofilen der Versuchsanlagen auf, dort jedoch in geringerer Abundanz. Derartige Fragmentlängen sind charakteristisch für verschiedene GRAM-positive Bakterien (160 bp und 520 bp; *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Nocardia* u.v.a.) sowie einige α -Proteobakterien (440 bp; z.B. *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Amaricoccus*).

In der KA Elsterwerda dominierten dagegen die Fragmentgrößen 115 bp, 493 bp und 520 bp (Abbildung 5.27 C). Dabei traten die Fragmente mit der Länge 115 bp nur in dieser Anlage auf. Sie sind charakteristisch für *Planctomycetes* und einige Vertreter der β -Proteobakterien sowie der Cytophaga-Flavobacterium-Gruppe. Von den 27 analysierten Klonen waren 3 Sequenzen den *Planctomycetes* und 3 Sequenzen der Cytophaga-Flavobacterium-Gruppe zuzuordnen.

Bakterien, die eine Fragmentlänge von ca. 493 bp liefern, stellen eine phylogenetisch sehr heterogene Gruppe dar, zu denen sowohl β - und γ -Proteobakterien als auch Vertreter der Cytophaga-Flavobacterium-Gruppe gehören. Hier konnte keine Übereinstimmung mit den 16S rDNA-Bibliotheken gefunden werden. Der hohe Peak bei 520 bp, der für die Gattungen *Lactobacillus* und *Enterococcus* charakteristisch ist, kann durch den hohen Anteil an Molkereiabwasser erklärt werden.

5.5.3.3 Vergleich der T-RFLP-Ergebnisse mit den 16S rRNA-Genbibliotheken

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die T-RFLP-Analyse zur Analyse von Belebtschlämmen geeignet ist. So konnten in den T-RFLP-Profilen der A/O- und der Phoredox-Anlage deutliche zeitliche Unterschiede in der Abundanz einzelner Peaks bzw. Fragmentlängen nachgewiesen werden. Ebenso konnten Unterschiede zwischen den untersuchten Anlagen gefunden werden und z.T. charakteristische Fragmentlängen für einzelne Anlagen bestimmt werden.

Es zeigte sich jedoch, dass diese Fingerprint-Technik zu einem deutlichen Verlust an Spezies-Information führt und somit eine geringere taxonomische Auflösung als z.B. die vergleichende 16S rDNA-Analyse aufweist.

So war die Zuordnung einzelner Peaks, d.h. Fragmentlängen, zu bestimmten Gattungen oder phylogenetischen Gruppen trotz Verwendung von zwei Restriktionsenzymen nur bedingt möglich. Zum einen ist dies durch die kurzen Erkennungssequenzen (4 bp) der eingesetzten Restriktionsenzyme zu erklären, die nur eine begrenzte Differenzierung der Bakterien ermöglichen. Auch ist die hohe Zahl an detektierten Fragmentlängen, die eine Vielzahl an Kombinationen bei der Auswertung der T-RFLP-Profile der verschiedenen Restriktionsenzymen ermöglichen, für den Verlust an Information verantwortlich. Zudem führt die große Anzahl an nicht kultivierten Umweltkeimen in der NCBI-Datenbank, deren phylogenetische Einordnung nicht erkennbar ist, zu einer verringerten Aussagekraft der Analyse.

Durch einen Vergleich mit den Sequenzdaten der 16S rDNA-Bibliotheken sind Aussagen über beteiligte Gattungen oder Gruppen möglich, wodurch zusätzliche Informationen für die Diskussion der Elektropherogramme verfügbar sind und z.T. eine Zuordnung von Gattungen zu einzelnen Fragmenten ermöglicht wird. Eine direkte Zuordnung der Sequenzen aus den Genbibliotheken bzw. deren nächsten Verwandten zu einzelnen Fragmenten der T-RFLP-Profile war in dieser Arbeit nicht möglich, da in der NCBI-Datenbank meistens nur Teilsequenzen enthalten sind, denen die TPU1-Bindungsstelle fehlt.

Der Informationsverlust, der bei einer T-RFLP-Analyse auftritt, sollte durch den Einsatz mehrerer Restriktionsenzyme (mindestens 3) und durch Erstellung mindestens einer rRNA-Genbibliothek kompensiert werden. So können durch den Einsatz mehrerer Restriktionsenzyme die Fragmentmuster einzelner Gattungen oder phylogenetischer Gruppen besser charakterisiert werden. Die gleichzeitige Analyse der rRNA-Genbibliothek erlaubt die Identifizierung vorkommender Organismen, wodurch zusätzliche Informationen für die Zuordnung einzelner Fragmente erhalten werden.

Die Anzahl der benötigten Enzyme und der DNA-Bibliotheken ergibt sich aus der mikrobiellen Heterogenität der Proben. Je heterogener die Biozönose ist und je größer die zeitlichen Veränderungen sind, desto größer sollte die Anzahl der eingesetzten Enzyme und der erstellten DNA-Bibliotheken sein. Weiterhin ist in diesem Fall abzuwägen, ob mit einer Restriktionsanalyse von spezifischen PCR-Produkten, wie z.B. für einzelne taxonomische Gruppen oder spezifische Gene, der Informationsgehalt erhöht und damit die Ergebnisse spezifiziert werden können.

5.5.4 Vergleichende 16S rDNA-Analyse

Um detailliertere Informationen über die mikrobielle Diversität im Belebtschlamm und die darin vertretenen Bakteriengattungen und -spezies zu erhalten, wurden in Ergänzung zur Fluoreszenz *in situ* Analyse für die Proben vom Versuchstag 30.07. 16S rDNA-Bibliotheken für beide Versuchsanlagen erstellt. Desweiteren wurden Genbibliotheken für die drei untersuchten kommunalen Kläranlagen erstellt, die jedoch einen kleineren Umfang besaßen.

5.5.4.1 Versuchsanlagen

Zusammensetzung der Genbibliotheken

Die erstellten 16S rRNA-Genbibliotheken der Versuchsanlagen enthielten insgesamt 74 Sequenzen der A/O-Anlage und 67 Sequenzen der Phoredox-Anlage. Insgesamt konnten diesen 141 analysierten Klonen 84 verschiedene Sequenzen aus der Datenbank (NCBI) zugeordnet werden. Bei 50% der Sequenzen (39 Klone aus der A/O-Anlage und 44 Klone aus der Phoredox-Anlage) handelte es sich um Sequenzen von bisher nicht kultivierten Mikroorganismen. Davon stammen 17 bzw. 11 Sequenzen aus Belebtschlammssystemen.

Auf Gattungsniveau, d.h. mit einer Ähnlichkeit von mehr als 97%, konnten ca. 35% der Klone, d.h. 27 Sequenzen der A/O-Anlage und 28 Sequenzen der Phoredox-Anlage, Sequenzen aus der Datenbank zugeordnet werden. Dagegen besaßen 11 (A/O-Anlage) bzw. 23 Klone (Phoredox-Anlage) mit einer Ähnlichkeit von weniger als 90% nur eine geringe Übereinstimmung zu bisher bekannten Sequenzen.

Für einen Vergleich der Diversität der Genbibliotheken wurde in Abbildung 5.28 die Anzahl der unterschiedlichen OTUs der Anzahl der analysierten Klone gegenübergestellt. Die Trendlinien wurden nach der Gleichung 5.1 (HILL et al., 2003) unter Verwendung der ermittelten Konstanten S^* und K berechnet.

Gleichung 5.1:
$$S(c) = S^* \cdot (1 - \exp^{-K \cdot c})$$

$S(c)$: Anzahl der OTUs bei c analysierten Klonen
 S^* : geschätzte Anzahl an OTUs in der Genbibliothek^{*)}
 (A/O-Anlage: 110 OTUs; Phoredox-Anlage: 60 OTUs)
 K : Konstante^{*)}
 (A/O-Anlage: 0,01; Phoredox-Anlage: 0,0165)

^{*)} Optimierung der Kurve

Aus Abbildung 5.28 ist zu entnehmen, dass die analysierten Klone nicht die vollständige Diversität der beiden Genbibliotheken wiedergeben. Bei einem Vergleich der gefundenen OTUs mit den ermittelten Konstanten zur Optimierung der Trendlinien stellen diese nur ca. 50% der geschätzten Anzahl an OTUs dar. Wird zur Kalkulation der maximalen Zahl an OTUs die Funktion nach CHAO (1984) verwendet, so erhält man eine deutlich höhere Anzahl an OTUs für die erstellten Genbibliotheken (A/O-Anlage: 209 ± 46 OTUs; Phoredox-Anlage: 109 ± 22).

Aus der Kalkulation der maximalen Anzahl der OTUs pro 16S rRNA-Genbibliothek ergibt sich zudem, dass die Genbibliothek der A/O-Anlage etwa doppelt so viele OTUs enthält wie die der Phoredox-Anlage. Diese größere Anzahl an OTUs in der Genbibliothek der A/O-Anlage ist auch an der größeren Steigung der Kurve zu erkennen. Bei 74 analysierten Klonen wurden 58 verschiedene Sequenzen ermittelt. Im Gegensatz dazu wurden in der Genbibliothek der Phoredox-Anlage nur 37 verschiedene Sequenzen bei 77 analysierten Klonen gefunden.

Die ermittelten Diversitäten der erstellten 16S rRNA-Genbibliotheken stimmen gut mit den Ergebnissen verschiedener Autoren überein, die von DAIMS (2001) zusammengestellt wurden. So entspricht die Diversität der A/O-Anlage den Ergebnissen von BOND et al. (1995), die zwei SBR mit einer erhöhten Phosphatelimination untersuchten, welche mit kommunalem bzw. mit Acetat aufgestocktem Abwasser betrieben wurden. Dagegen wurde in den Untersuchungen einer kontinuierlichen Laboranlage von CHRISTENSSON et al. (1998) eine 16S rRNA-Genbibliothek erstellt, die in ihrer Diversität in etwa der Phoredox-Anlage ähnelte.

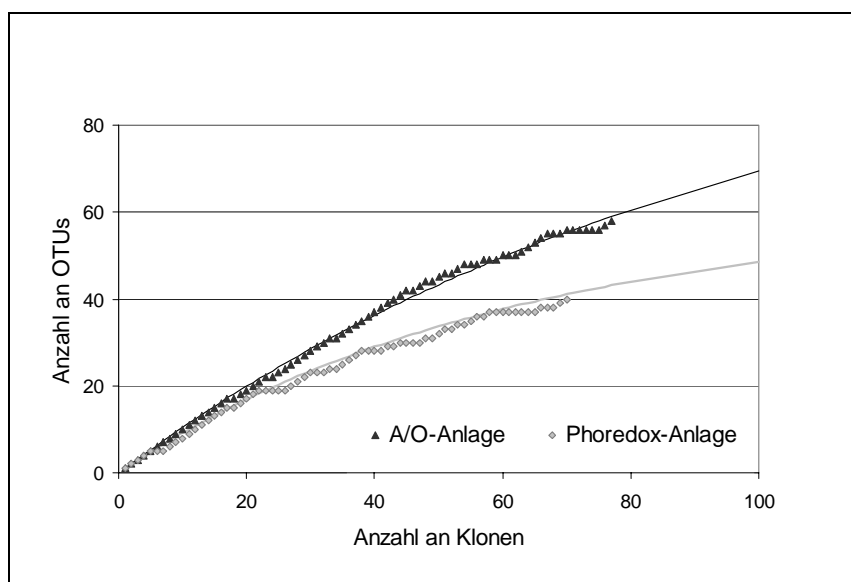


Abbildung 5.28:
Vergleich der Anzahl der OTUs in Abhängigkeit von der Anzahl der analysierten Klone

Vergleicht man auf Gruppenniveau die Zusammensetzung der 16S rRNA-Genbibliotheken mit den Ergebnissen der *in situ* Analyse, so zeigt sich, dass die Vertreter der α -Proteobakterien und der HGC-Gruppe in den Genbibliotheken mit ca. 50% dominieren, während sie bei der *in situ* Analyse nur einen Anteil von 30% besaßen (Abbildung 5.29).

Dagegen ist die Gruppe der β -Proteobakterien in der Anzahl ihrer Sequenzen unterrepräsentiert. So gehören nur 11 der 141 analysierten Sequenzen, d.h. ca. 7%, zu dieser phylogenetischen Gruppe. In der Fluoreszenz *in situ* Analyse zeigte diese Gruppe einen prozentualen Anteil von ca. 20%.

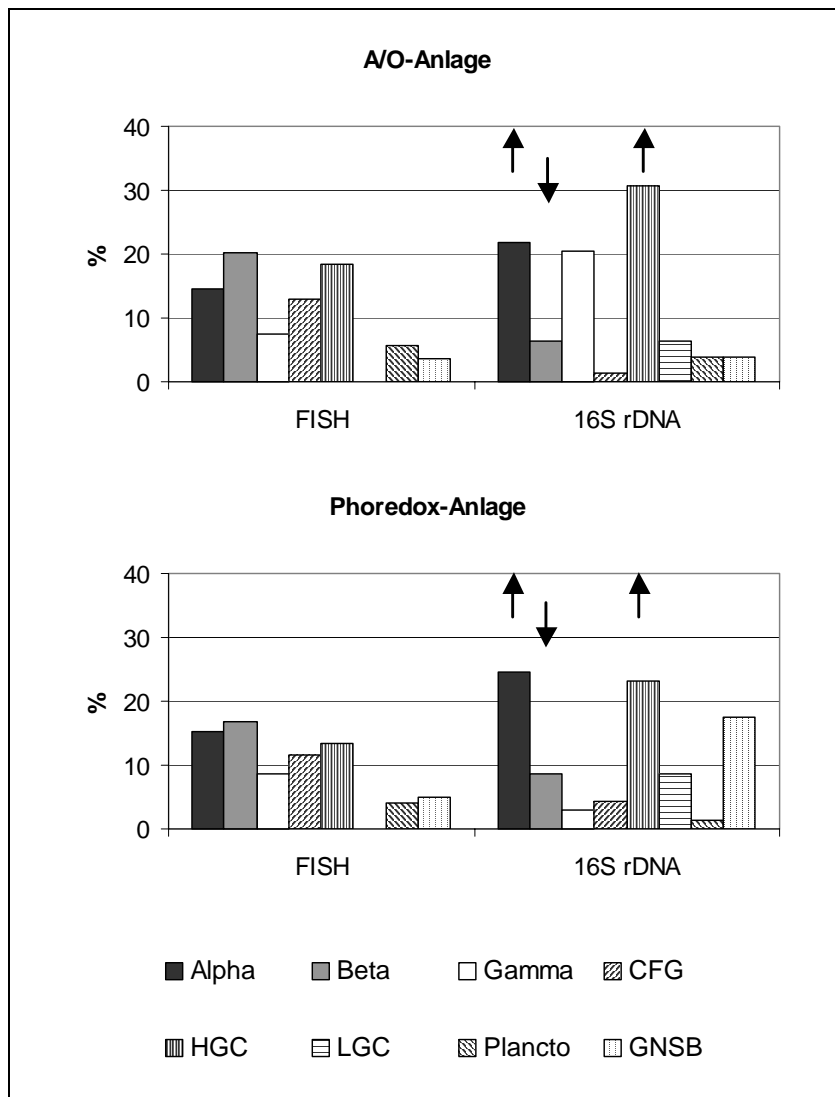


Abbildung 5.29:
Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA-Genbibliotheken auf Gruppenniveau (% Klone) mit den Ergebnissen der FISH-Analyse (% Sonde [DAPI]). Die Pfeile markieren die veränderte prozentuale Zusammensetzung im Vergleich zur FISH-Analyse (↑: Zunahme; ↓: Abnahme).

Physiologische Gruppen

Im Folgenden soll speziell auf die Gruppe der Ammonium oxidierenden Bakterien und auf zwei Gruppen Phosphat akkumulierender Bakterien, d.h. die *Rhodocyclus*-Gruppe und GRAM-positive Bakterien, die mit der Gattung *Tetrasphaera* assoziiert sind, eingegangen werden.

Da die β -Proteobakterien, die in der *in situ* Analyse mit ca. 20% die dominierende Gruppe darstellten, in den 16S rDNA-Bibliotheken der beiden Versuchsanlagen einen prozentualen Anteil von nur ca. 7% aufweisen, sind physiologische Gruppen, die den β -Proteobakterien zugeordnet werden, vermutlich ebenfalls unterrepräsentiert.

Dies wären zum einem die Ammonium oxidierenden Bakterien des *Nitrosomonas*-Clusters, zum anderen die *Rhodocyclus*-Gruppe. Trotz der deutlichen Nitrifikationsleistung der Phoredox-Anlage und des positiven Nachweises von Ammonium oxidierenden Bakterien in der *in situ* Analyse waren in keiner der beiden Genbibliotheken Sequenzen dieser phylogenetischen Gruppe repräsentiert.

Auch die *Rhodocyclus*-Gruppe, die *in situ* einen Anteil von ca. 5% ausmachte (Kapitel 5.5.1.4.2), war in der 16S rRNA-Genbibliothek der Phoredox-Anlage mit nur zwei Sequenzen (P2CN19, P2CN56) vertreten. Diese stimmten beide zu 98% mit einer *Rhodocyclus*-Sequenz (AF204247, CROCETTI et al., 2000) aus einer SBR-Belebtschlammanlage überein (Abbildung 5.30).

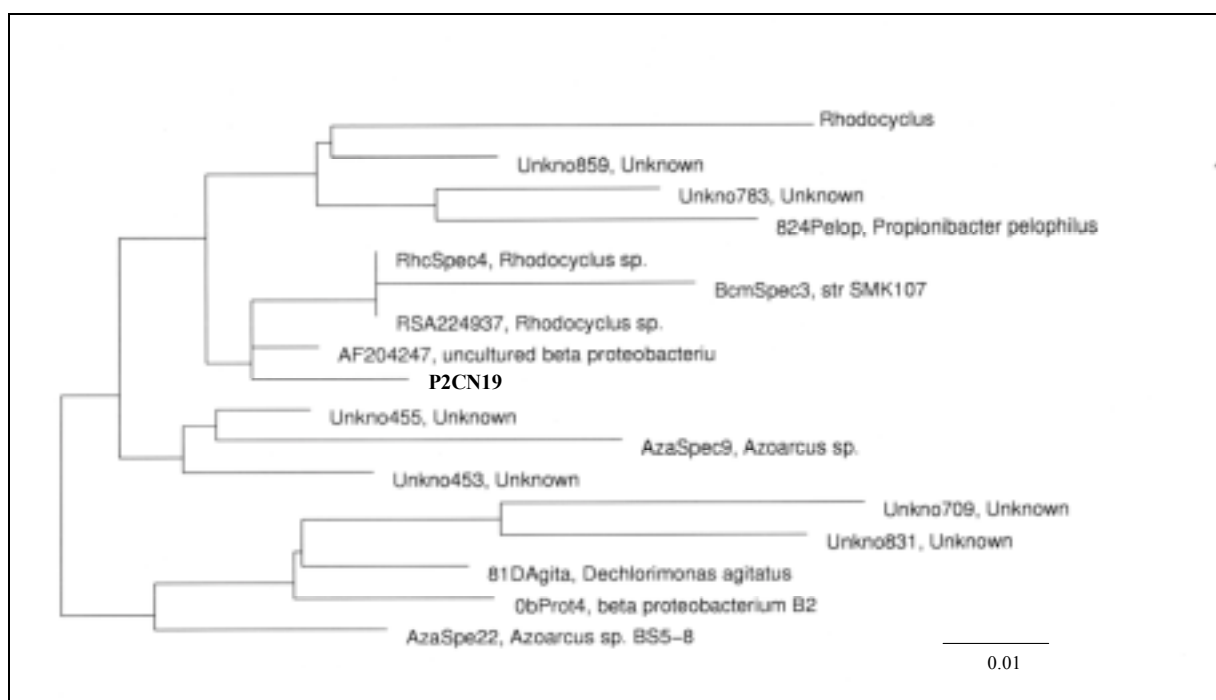


Abbildung 5.30: 16S rDNA-Dendrogramm, in dem die phylogenetische Position der Teilsequenz P2CN19 (532 Nukleotide) aus der 16S rRNA-Genbibliothek der Phoredox-Anlage dargestellt ist

In der Genbibliothek der A/O-Anlage waren keine vergleichbaren Sequenzen vertreten. Die weiteren Klone, die β -Proteobakterien repräsentierten, wurden den Gattungen *Thiobacillus*, *Dechloromonas* und *Neisseria* zugeordnet

Im Gegensatz dazu waren in beiden 16S rDNA-Bibliotheken Sequenzen GRAM-positiver Mikroorganismen repräsentiert, die phylogenetisch zur Gattung *Tetrasphaera* assoziierten (Abbildung 5.31). Aber auch Sequenzen von fadenförmigen Bakterien, die beim Auftreten von Schwimmschlamm eine besondere Rolle spielen, wie z.B. *Microthrix* (Abbildung 5.32), *Nostocoida* oder *Nocardioides*, wurden gefunden. Weitere GRAM-positive Klone assoziierten zu den Gattungen *Streptomyces*, *Propionibacterium* oder *Terracoccus*.

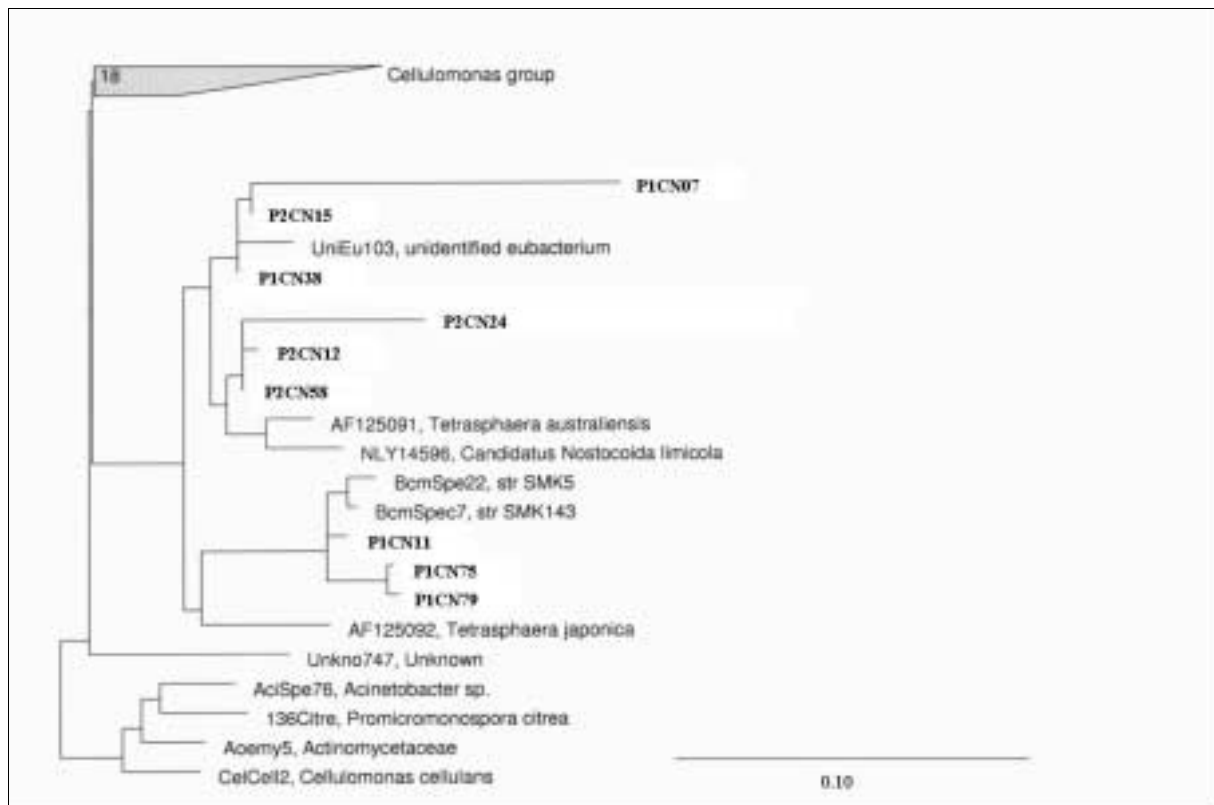


Abbildung 5.31: 16S rDNA-Dendrogramm, in dem die phylogenetische Position von Teilsequenzen aus den Genbibliotheken der beiden Versuchsanlagen (P1: A/O-Anlage; P2: Phoredox-Anlage; CN: clone number) dargestellt sind, die mit der Gattung *Tetrasphaera* assoziiert wurden

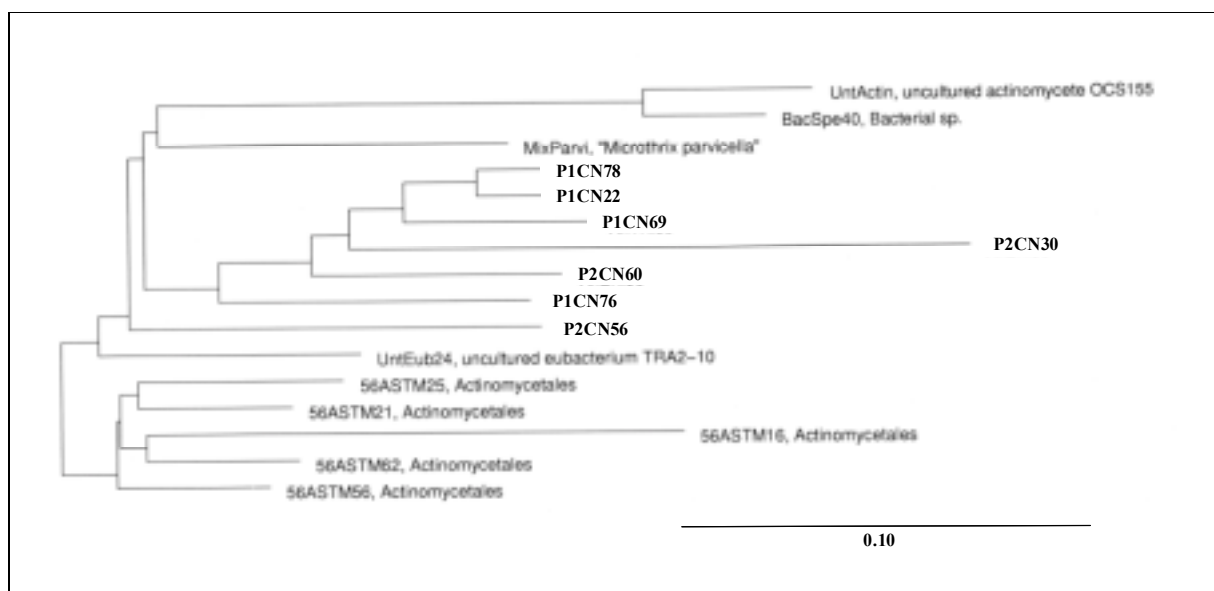


Abbildung 5.32: 16S rDNA-Dendrogramm, in dem die phylogenetische Position von Teilsequenzen aus den Genbibliotheken der beiden Versuchsanlagen (P1: A/O-Anlage; P2: Phoredox-Anlage; CN: clone number) dargestellt sind, die mit der Gattung *Microthrix* assoziiert wurden

5.5.4.2 Kommunale Kläranlagen

Für einen Vergleich der Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken der Versuchsanlagen mit weiteren Kläranlagen wurden auch Genbibliotheken für die untersuchten kommunalen Kläranlagen erstellt. Diese enthielten jedoch nur ca. 30 Sequenzen.

Vergleichbar zu den Untersuchungen der beiden Versuchsanlagen ist davon auszugehen, dass auch diese Genbibliotheken nur einen Ausschnitt der mikrobiellen Diversität darstellen. Dies ist in Abbildung 5.33 zu erkennen, in der die Anzahl der unterschiedlichen Sequenzen in den Genbibliotheken den analysierten geklonten PCR-Produkten gegenüber gestellt wurde. Dabei zeigten unabhängig von der untersuchten Kläranlage ca. 85-90% der analysierten Klone unterschiedliche Sequenzen. Ein signifikanter Unterschied in der Diversität der Genbibliotheken ist auf der Grundlage der analysierten Klone nicht zu erkennen.

Jedoch traten deutliche Unterschiede zwischen den Genbibliotheken in der Ähnlichkeit der Sequenzen zu Sequenzen der NCBI-Datenbank auf. So besaßen in der Genbibliothek der KA Dresden-Kaditz ca. 66% der Sequenzen eine Ähnlichkeit >97% zu bekannten Sequenzen, in der Bibliothek der KA Elsterwerda ca. 50%. In den Genbibliotheken der KA Bad Liebenwerda und der Versuchsanlagen hatten dagegen nur ca. 35% der Sequenzen eine solche Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der Datenbank.

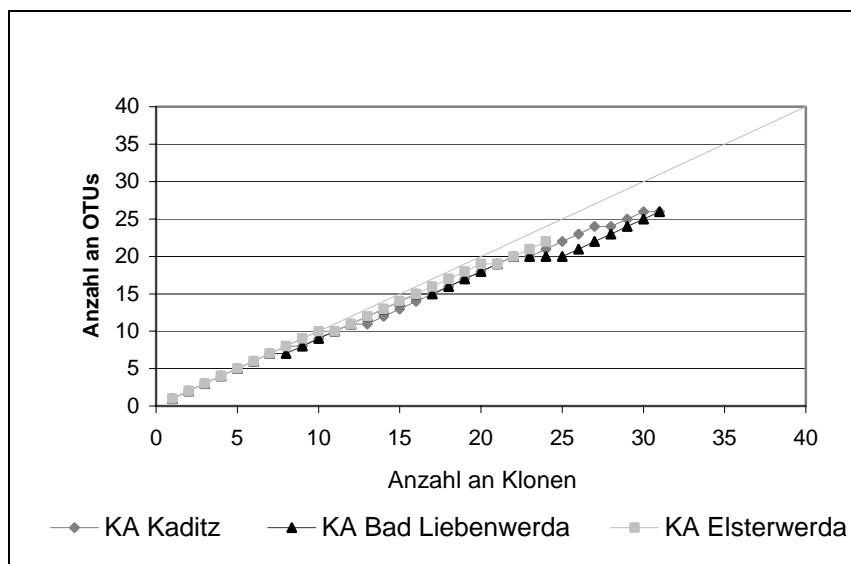


Abbildung 5.33:
Vergleich der Anzahl der OTUs in Abhängigkeit von der Anzahl der analysierten Klone.

Vergleicht man die auf Basis der 24 bzw. 31 sequenzierten Klone erstellten Genbibliotheken mit den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierung, so wird deutlich, dass die Genbibliotheken der Kläranlagen, ebenso wie die der Versuchsanlagen, nicht die tatsächliche mikrobielle Diversität reflektieren. Wiederum ist die Gruppe der β -Proteobakterien in den erstellten 16S rDNA Bibliotheken stark unterrepräsentiert (Abbildung 5.34). So konnte nur eine einzige Sequenz aus der Genbibliothek der KA Kaditz dieser Gruppe zugeordnet werden.

Wie schon im Kapitel 5.5.4 diskutiert, sind durch den geringen Anteil an β -Proteobakterien auch physiologische Gruppen innerhalb dieses Phylums in den 16S rDNA-Bibliotheken nur im geringen Maße vertreten. So war in keiner der drei Genbibliotheken eine Sequenz aus der *Rhodocyclus*-Gruppe oder der Gruppe der Ammonium oxidierenden Bakterien repräsentiert.

Im Vergleich dazu waren in der 16S rRNA-Genbibliothek der Kläranlage Bad Liebenwerda Sequenzen der Gattung *Tetrasphaera* und in der 16S rRNA-Genbibliothek der KA Elsterwerda Sequenzen der Gattung *Microlunatus* enthalten. Für Vertreter beider Gattungen konnte eine Polyphosphatspeicherung nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung dieser Gattungen an der erhöhten biologischen Phosphatelimination vermutet werden kann.

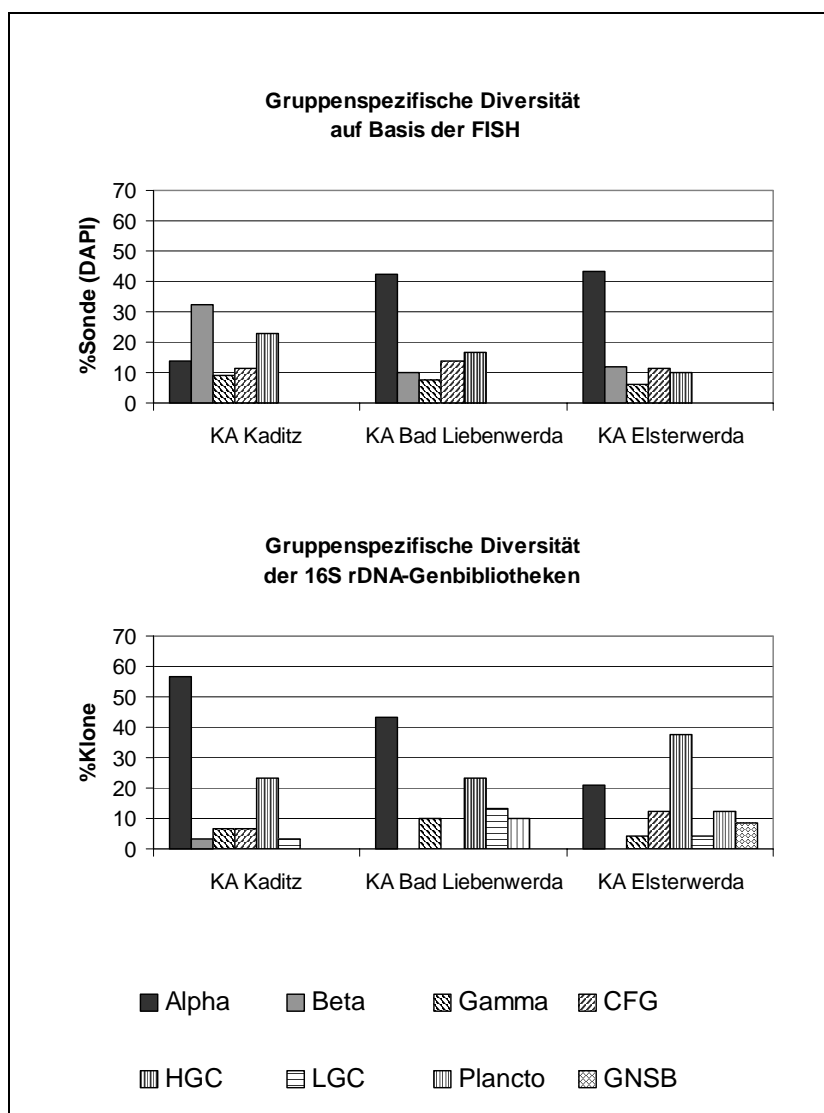


Abbildung 5.34:

Vergleich der Zusammensetzung der 16S rRNA-Genbibliotheken auf Gruppenniveau (% Klone) mit den Ergebnissen der FISH-Analyse (% Sonde [DAPI]).

In beiden 16S rDNA-Bibliotheken waren zudem, vergleichbar zu den Genbibliotheken der Versuchsanlagen, einige Sequenzen von Vertretern des Phylums *Planctomycetes* (je drei) enthalten. Zudem wurden in der Genbibliothek der KA Elsterwerda trotz der kleinen Anzahl an analysierten Klonen zwei Sequenzen gefunden, die der Gattung *Nitrospira* zugeordnet werden konnten. Weitere Sequenzen von Organismen, die an der aeroben Ammonium- und Nitrit-Oxidation beteiligt sind, waren jedoch nicht nachweisbar.

Dagegen unterschied sich die Zusammensetzung der 16S rRNA-Genbibliothek der KA Kaditz deutlich von den beiden anderen kommunalen Kläranlagen. Diese Genbibliothek war stark von der Gruppe der α -Proteobakterien dominiert (>55%), die durch sehr unterschiedliche Gattungen, wie z.B. *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Bradirhizobium* und *Sphingomonas*, vertreten wird. Zwei Sequenzen der HGC-Gruppe assoziieren mit einer Ähnlichkeit von ca. 88% zur Gattung *Microthrix*.

5.5.4.3 Vergleich mit Literaturwerten

Quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung von 16S rDNA-Bibliotheken im Vergleich zu entsprechenden *in situ* Analysen werden durch Literaturangaben bestätigt. In Tabelle 5.5 sind einige Literaturangaben über die mikrobielle Diversität von Belebtschlämmen aus Abwasserreinigungsanlagen zusammengestellt.

Aus den Untersuchungen von CROCETTI et al. (2000) sowie von LIU et al. (2001) an Laboranlagen mit synthetischem Abwasser (850 mg Acetat l⁻¹ bzw. 100 mg Acetat l⁻¹) ist ebenfalls eine deutliche Verschiebung der Dominanz der β -Proteobakterien (FISH) zur Cytophaga/ Flavobacteria-Gruppe in den 16S rRNA-Genbibliotheken ableitbar.

JURETSCHKO et al. (1998) untersuchten eine industrielle Anlage zur Nitrifikation und Denitrifikation. Sowohl bei der *in situ* Analyse als auch in der 16S rRNA-Genbibliothek dominierten β -Proteobakterien, jedoch war der Anteil an α -Proteobakterien in der Genbibliothek deutlich höher.

Demgegenüber ist nach SNAIDR et al. (1997), die eine kommunale Kläranlage untersuchten, der Anteil an β -Proteobakterien bei beiden molekularbiologischen Verfahren mit 41% bzw. 35% ähnlich hoch. Auffällig ist hierbei aber das Fehlen GRAM-positiver Bakterien in der Genbibliothek, die bei der *in situ* Analyse einen prozentualen Anteil von über 10% aufwiesen. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die Autoren den Belebtschlamm direkt, d.h. ohne eine vorherige DNA-Isolierung, in der PCR eingesetzt haben. Hierdurch wird vor allem die 16S rDNA von GRAM-negativen Organismen amplifiziert, da GRAM-positive Bakterien, aufgrund ihrer Zellwandstruktur während der PCR nur ungenügend lysiert werden, und damit in der Genbibliothek nicht vertreten sind.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die bekannte Problematik der quantitativen Verschiebung der prozentualen Anteile einzelner Bakteriengruppen bei Anwendung PCR-basierter molekularer Verfahren. Auch die Analyse einer grossen Anzahl an Klonen, wie z.B. bei CROCETTI et al. (2000), führt daher nicht unbedingt zu besseren Resultaten.

Tabelle 5.5: Vergleich der Literaturangaben zur Fluoreszenz *in situ* Analyse und der Zusammensetzung der 16S rRNA-Genbibliotheken auf Gruppenniveau (Angaben in Prozent; dominierende Gruppen wurden grau unterlegt)

Autor	Art der Anlage	Art des Abwassers	Art der Analyse	Proteobakterien			HGC	CF
				alpha	beta	gamma		
CROCETTI et al. (2000)	Laboranlage (SBR)	synthet. Abwasser	FISH	12	80		28	14
	(281 Klone)		16S rDNA	14	5		24	30
LIU et al. (2001)	Laboranlage	synthet. Abwasser	FISH	9,5	41,3	6,8	17,9	4,5
	(150 Klone)		16S rDNA	4,7	14	7,3	9,3	50
SNAIDR et al. (1997)	Kommunale Anlage	kommun. Abwasser	FISH	8	41	12	13	12
	(62 Klone)		16S rDNA ^{**})	4	35	13	--	2
JURTSCHKO et al. (1998)	Industrielle Anlage ^{*)}		FISH	16	47	2		
	(94 Klone)		16S rDNA	25	31	--	--	1
diese Arbeit	A/O-Anlage	kommun. Abwasser	FISH	14,6	20,3	7,4	18,4	12,9
	(74 Klone)		16S rDNA	21,8	6,4	20,5	30,8	1,3
diese Arbeit	Phoredox-Anlage	kommun. Abwasser	FISH	15,3	16,8	8,6	13,5	11,5
	(67 Klone)		16S rDNA	24,6	8,7	2,9	23,2	4,3

^{*)} Industrielle Anlage zur Nitrifikation und Denitrifikation

^{**)} Belebtschlamm wurde ohne Vorbehandlung, d.h. ohne DNA-Isolierung, in der PCR eingesetzt

Die systematischen Fehler der 16S rDNA basierten Methoden sind bekannt (vgl. Kap. 3.1) und beruhen zum Teil auf der unterschiedlichen Effizienz der Zell-Lyse und der DNA-Isolierung. Aber auch eine unterschiedliche Anzahl an rRNA-Operonen bei verschiedenen Spezies sowie eine PCR-bedingte Selektivität, beispielsweise für Templates mit niedrigem G+C-Gehalt, könnten eine Ursache für diese Abweichungen sein (WINTZINGERODE et al., 1997; SUZUKI et al., 1996; HEAD et al., 1998).

5.5.5 Spezifische PCR für Ammonium oxidierende Bakterien

Aufgrund des positiven Nachweises von Ammonium oxidierenden Bakterien (AOB) in der A/O-Anlage mittels *in situ* Hybridisierung wurde eine spezifische PCR für ein 491 bp langes Fragment des Ammoniummonooxygenase Gens (*amoA*) durchgeführt. Entsprechend der Ergebnisse der FISH konnten auch in diesen Untersuchungen in beiden Anlagen über den gesamten Versuchszeitraum spezifische PCR-Produkte der entsprechenden Länge amplifiziert werden. Abbildung 5.35 zeigt ein Agarosegel mit Banden entsprechender PCR-Produkte der A/O-Anlage sowie der Kläranlagen Bad Liebenwerda und Kaditz.

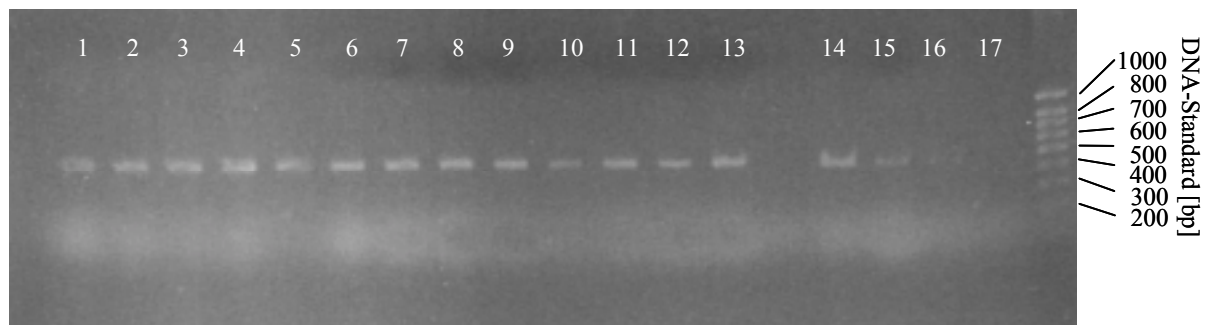


Abbildung 5.35: Agarose-Gel mit *amoA*-spezifischen PCR-Produkten (1-13: A/O-Anlage 30.07., 13.08., 27.08., 10.09., 24.09., 15.10., 22.10., 05.11., 12.11., 03.12., 21.01., 04.02. und 18.02.; 14+15: KA Bad Liebenwerda 21.07. und 19.11.; 16: KA Kaditz 01.07.; 17: negativ Kontrolle)

In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass von allen Belebtschlammproben der A/O-Anlage (Spuren 1-13) und der KA Bad Liebenwerda (Spuren 14 und 15) PCR-Produkte der entsprechenden Fragmentlänge amplifiziert wurden. Für die KA-Kaditz, die keine Nitrifikationsstufe besitzt, konnte dagegen nur eine sehr schwache Bande gefunden werden.

5.5.6 Klonierung der AOB-spezifischen PCR-Produkte

Zur Bestätigung der Spezifität der PCR-Produkte und für eine eingehende phylogenetische Differenzierung der *amoA*-spezifischen PCR-Produkte wurde von beiden Versuchsanlagen das PCR-Produkt vom 30.07. in *E. coli* kloniert und jeweils 27 bzw. 30 Klone sequenziert. In Abbildung 5.36 wurden die analysierten Sequenzen einigen Sequenzen aus der NCBI-Datenbank in Hinblick ihrer Sequenzähnlichkeit gegenübergestellt. Wie gut zu erkennen ist, zeigen viele der Sequenzen (23 von 27) aus der A/O-Anlage eine hohe Übereinstimmung (95,5% und 98,3%) zur Datenbanksequenz AF202652.

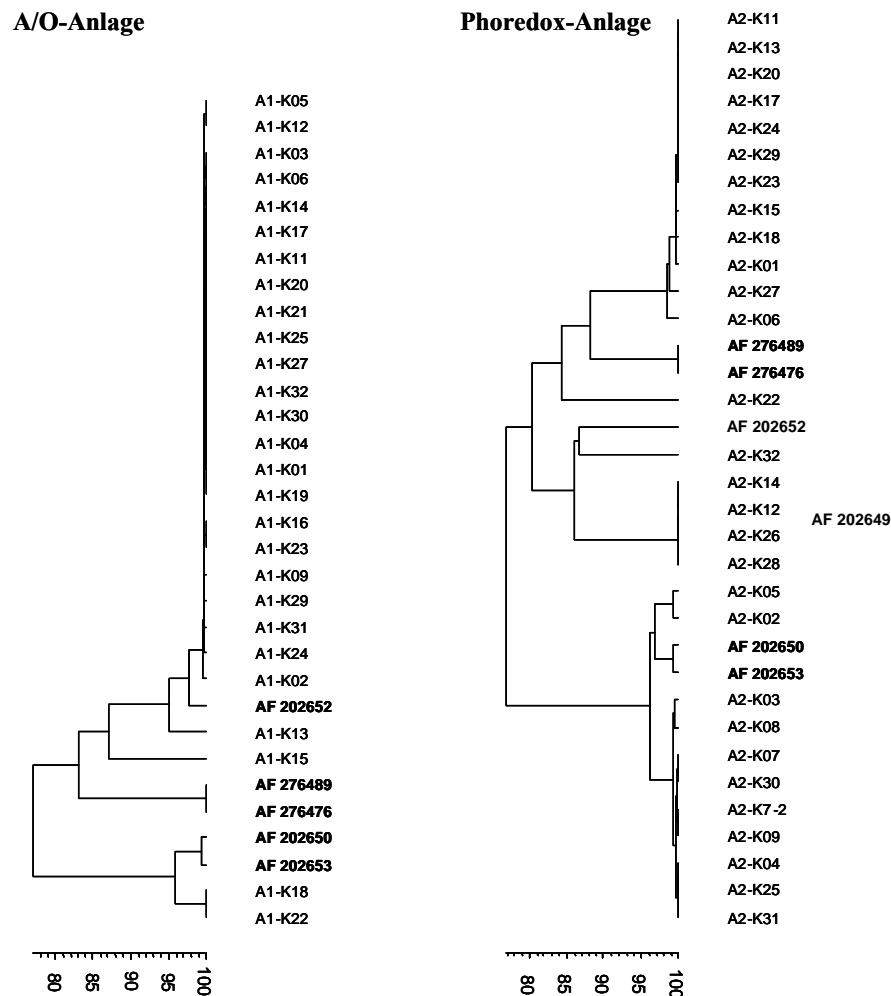


Abbildung 5.36: Dendrogramm auf Grundlage der Sequenzähnlichkeit der analysierten Klone zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank (Software: BioNumerics)

Dagegen verteilen sich die Sequenzen aus der Phoredox-Anlage auf drei verschiedene Cluster. In einem Cluster weisen 12 der 30 Klone eine Ähnlichkeit von 88,0-88,5% zu der Sequenz AF276489 auf. 5 der 30 Klone zeigen große Übereinstimmung zu Sequenzen von *Nitrosomonas europaea* (ca. 91%) bzw. zur Sequenz AF202649 (ca. 87%). Weitere 11 der 30 Sequenzen zeigen Homologie (95,9-97,2%) zu den Sequenzen AF202650 und AF202653.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 5.6 die vier dominanten Cluster, deren phylogenetische Einordnung und die Anzahl der assoziierten Sequenzen zusammengestellt.

Tabelle 5.6: Übersicht über die dominierenden amoA-Sequenzen und deren phylogenetische Einordnung

	Biofilm clon S1 (AF202650)	Biofilm clon S5 (AF202652)	Biofilm clon S6 (AF202649)	Unidentified bacterium S12 (AF276489)
Isoliert aus	anoxischer Tropfkörper	anoxischer Tropfkörper	anoxischer Tropfkörper	aerober Tropfkörper
assoziiert zu	<i>Nc. mobilis</i>	<i>N. eutropha</i>	<i>N. europaea</i>	<i>N. spec.</i>
A/O-Anlage	2 (27)	23 (27)		
Phoredox-Anlage	11 (30)		5 (30)	12 (30)

Die Sequenzen AF202649-AF202653, zu denen einige der analysierten Klone große Übereinstimmung zeigten, wurden aus einer Tropfkörperanlage zur anoxischen Ammonium-oxidation isoliert (SCHMID et al., 2000). Phylogenetisch gruppiert die Sequenz AF202650 (biofilm clone S1) zu *Nitrosococcus mobilis* und die Sequenz AF202652 (biofilm clone S5) zu *Nitrosomonas eutropha*. Die Sequenzen AF202654 (biofilm clone S3) und AF202649 (biofilm clone S6) weisen dagegen eine hohe Ähnlichkeit zu *Nitrosomonas europaea* (SCHMID et al., 2000) auf.

Die Sequenz AF276489 (unidentified bacterium S12) wurde aus Biofilmproben eines Tropfkörpers isoliert, der zur Nitrifizierung von Abwasser aus der Schlammfaulung eingesetzt wurde (PURKHOLD et al., 2000; SCHMID et al., 2000).

Zur Verdeutlichung der taxonomischen Einordnung der gefundenen Sequenzen wurde in Abbildung 5.37 das *N. europaea/Nc. mobilis*-Cluster aus dem phylogenetischen Dendrogramm von PURKHOLD et al. (2000) separat dargestellt. Sequenzen von Reinkulturen sind grau unterlegt; die oben erwähnten Sequenzen wurden umrahmt. Als Vertreter der beiden Sequenzen AF202654 (biofilm clone S3) und AF202649 (biofilm clone S6) ist im Dendrogramm die Sequenz AF202654 aufgeführt.

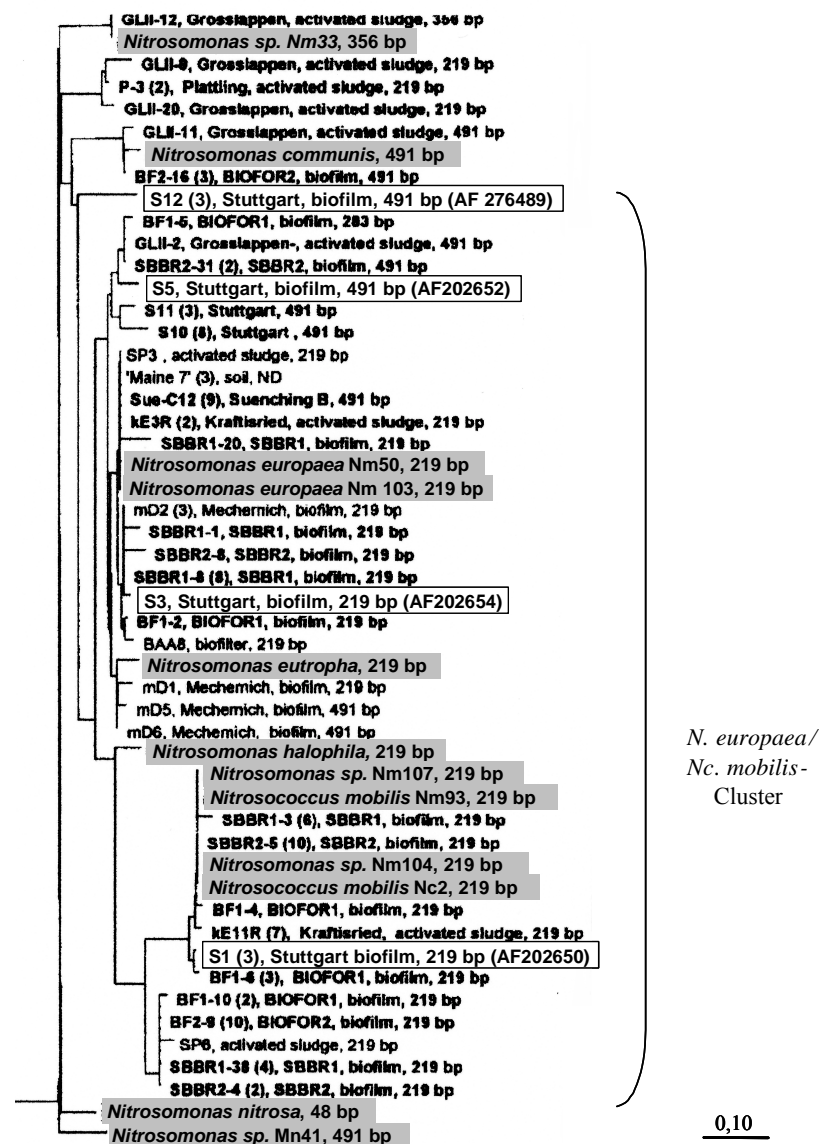


Abbildung 5.37: Fitch-Margoliash Dendrogramm zur phylogenetischen Einordnung von *amoA*-Sequenzen (übernommen aus PURKHOLD et al., 2000). Die Sequenzen von Reinkulturen wurden grau unterlegt. Die durch Datenbankvergleich in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen sind eingrahmt. Die Balkenlänge entspricht 10% Diversität.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Charakterisierung der *amoA*-spezifischen PCR-Produkte stimmen gut mit der FISH-Analyse überein. Alle gefundenen *amoA*-Sequenzen gruppieren in das *Nitrosomonas europaea*/*Nitrosococcus mobilis*-Cluster, welches durch die Oligonukleotidsonden NSO1225 und NEU (MOBARRY et al., 1996; JURETSCHKO et al., 1998; KOOPS et al., 2001) detektiert wird. Diesem Cluster wurden auch die meisten AOB-Sequenzen von Klonen aus Anlagen zur Abwasserreinigung zugeordnet. Desweiteren gehören auch viele der bisher beschriebenen Isolate aus derartigen Anlagen in diese Gruppe (PURKHOLD et al., 2000).

Eine quantitative Bewertung der amoA-Cluster ist aufgrund der Selektivität der PCR nicht zulässig, doch deuten die Ergebnisse aufgrund der drei unterschiedlichen Cluster an amoA-Sequenzen auf eine höhere Diversität der Gruppe der Ammonium oxidierenden Bakterien in der Phoredox-Anlage hin, da in der A/O-Anlage nur ein dominierendes Cluster mit 23 von 27 Klonen identifiziert wurde.

Die gefundenen amoA-Sequenzcluster können zudem zwei unterschiedlichen Habitaten, einem aeroben und einem anoxischen Biofilm, zugeordnet werden. Dies deutet auf zwei verschiedene Gruppen von Ammonium-Monooxygenasen mit unterschiedlichen Sauerstoffaffinitäten hin. Zum einen auf eine Gruppe von Enzymen, die für höhere Sauerstoffkonzentrationen (aerober Biofilm) optimiert sind, zum anderen auf eine Gruppe von Enzymen mit Anpassung an sauerstofflimitierte Bedingungen (anoxischer Biofilm).

Die amoA-Sequenzen aus der A/O-Anlage zeigen dagegen eine geringere Diversität. Sie assoziieren mit einer Sequenz aus einem anoxischen Biofilm, die in der Phoredox-Anlage nicht gefunden wurde. Aufgrund der höheren Schlammbelastung sind in der A/O-Anlage höhere Respirationsraten zu erwarten. Dadurch können in Teilen der Belebtschlammflocken anoxische Mikro-Nischen entstehen (SCHRAMM et al., 1999). Dies könnte die Dominanz der amoA-Sequenzen aus dem anoxischen Biofilm und die geringere Diversität erklären. Unter Sauerstofflimitation sind einige Subspezies von *N. europaea* und *N. eutropha* (BOCK et al., 1991; SCHMIDT & BOCK 1997) und Vertreter der *Planctomycetes* (STROUS et al., 1999) in der Lage, eine anaerobe Ammonifikation durchzuführen.

5.5.7 Vorkommen von fadenförmigen Bakterien

5.5.7.1 Bestimmung der Fädigkeit nach EIKELBOOM & VON BJUISEN

Die Quantifizierung und Identifizierung der fadenförmigen Bakterien in den Belebtschlammflocken der Versuchsanlagen wurde nach dem Bestimmungsschlüssel von EIKELBOOM & VON BJUISEN (1983) durchgeführt. In den beiden Versuchsanlagen wurde im Untersuchungszeitraum eine durchschnittliche Fädigkeit zwischen 0,5 und 2 gefunden. Die Flockenstruktur war kompakt bis unregelmäßig. In Abbildung 5.38 sind die ermittelten Fädigkeitskategorien gegen die Zeit aufgetragen.

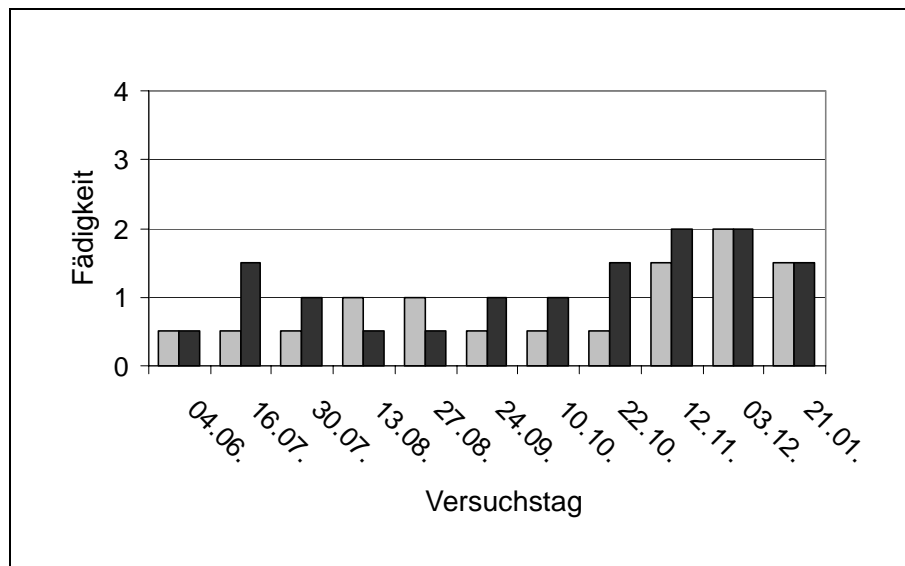


Abbildung 5.38: Anteil fadenförmiger Bakterien im Belebtschlamm der Versuchsanlagen nach dem Bestimmungsschlüssel von EIKELBOOM & VAN BUIJSEN, 1992. (□ A/O-Anlage, ■ Phoredox-Anlage)

In beiden Versuchsanlagen konnten, wie zu erwarten war, über den gesamten Versuchszeitraum fadenförmige Bakterien nachgewiesen werden. Als dominierende Spezies wurde *Microthrix parvicella* identifiziert. Daneben traten deutlich untergeordnet *Sphaerotilus natans*, Eikelboom Typ 0041 und *Haliscomenobacter hydrossis*, z.T. nur als Einzelfunde, auf.

Die deutliche Zunahme der Fädigkeit in den Monaten Oktober bis Dezember ist durch die sinkenden Temperaturen und der daraus resultierenden Zunahme der Gattung *Microthrix* aufgrund ihres niedrigen Temperaturoptimums ($<15^{\circ}\text{C}$, KUNST et al., 2000) zu erklären (Abbildung 5.38). Die Ursache für die Zunahme der Fädigkeit des Belebtschlammes in der A/O-Anlage im Juli war auf technische Probleme mit der Rücklaufschlammpumpe zurückzuführen.

Im direkten Vergleich wies die Phoredox-Anlage im Untersuchungszeitraum einen deutlich höheren Anteil an fadenförmigen Bakterien auf. Dies ist durch die geringere Schlammbelastung von $0,18 \text{ kg BSB}_5 \cdot \text{kg TS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ zu erklären, die fadenförmige Organismen im Wachstum fördert. Beispiele für typische Low F/M-Bakterien des fadenförmigen Typus, die häufig in niedrig belasteten Anlagen vorkommen, sind *Microthrix parvicella* sowie Typ 0041 (KUNST et al., 2000).

5.5.7.2 Spezifische Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Zur genauen Identifizierung der fadenförmigen Bakterien wurden nach der lichtmikroskopischen Analyse spezifische Oligonukleotidsonden (Anhang A-1) eingesetzt. Dazu wurden nicht homogenisierte Belebtschlammproben *in situ* unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Der Anteil an *Microthrix parvicella* und an nocardioformen Actinomyceten konnte *in situ* nicht quantifiziert werden, da die Zellwand dieser Organismen ohne eine enzymatische Vorbehandlung (SCHUPPLER et al., 1998; WAGNER et al., 1994) nicht für fluoreszenzmarkierte Sonden permeabel ist. Eine Abschätzung der Abundanz erfolgte deshalb für nocardioforme Actinomyceten an nicht homogenisierten Proben nach einer Vorbehandlung mit Mutanolysin mit Hilfe der Sonde MNP1 (SCHUPPLER et al., 1998). *Microthrix parvicella* wurde anhand der Morphologie und der gespeicherten Polyphosphatgranula identifiziert sowie deren Abundanz am gefärbten Präparat abgeschätzt.

Von den untersuchten fadenförmigen Bakterien konnten nur *Microthrix parvicella* und Bakterien, die mit der Sonde Sna23a hybridisieren (*Sphaerotilus natans*, Eikelboom Typ 1701, *Leptothrix cholodnii*) über den gesamten Untersuchungszeitraum in den Belebtschlammproben nachgewiesen werden.

Dominiert wurden die Biozönosen beider Versuchsanlagen von *Microthrix parvicella* (Abbildung 5.39). Schwankungen in der Abundanz dieser Spezies korrelierten gut mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Auswertung nach EIKELBOOM & VAN BUIJSEN.

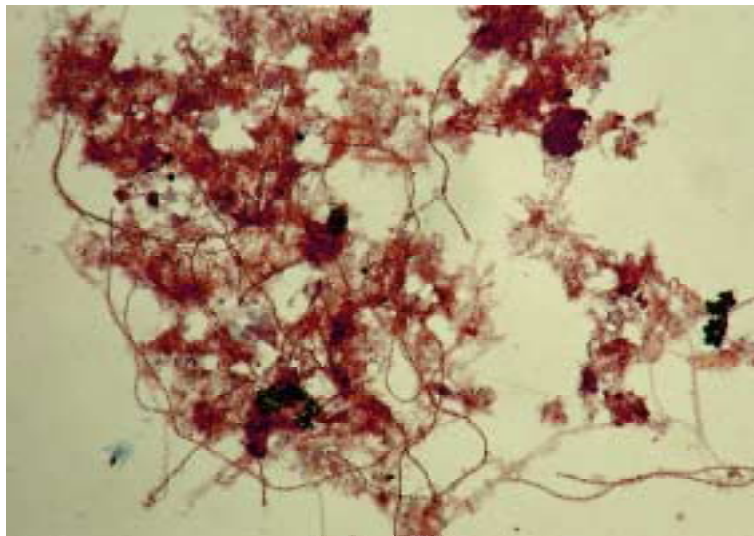


Abbildung 5.39: Belebtschlammflocken aus der Phoredox-Anlage nach einer Neisser-Färbung

Die Sna23a-positiven Bakterien (*Sphaerotilus* spec. und verwandte Arten) spielten im Vergleich dazu innerhalb der fadenförmigen Bakterien nur eine untergeordnete Rolle. Diese Bakterien sind charakteristisch für höher belastete Anlagen ($B_{TS} \geq 0,3 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg TS}^{-1} \text{ d}^{-1}$) und werden durch Stoßbelastungen und niedrige Sauerstoffkonzentrationen gefördert. Dies erklärt die höhere Abundanz dieser Bakterien in der A/O-Anlage (1,6-9,2%), da diese Anlage mit $0,45 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg TS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ eine mehrfach höhere Schlammbelastung besaß.

Die Abundanz dieser Bakterien variierte stark innerhalb des Versuchszeitraumes (Abbildung 5.40). Die geringste Abundanz wurde in dem Zeitraum vom 24.09. bis 22.10. (A/O-Anlage) bzw. 13.08.-05.11. (Phoredox-Anlage) beobachtet. Eine direkte Korrelation mit chemischen oder physikalischen Parametern konnte nicht festgestellt werden.

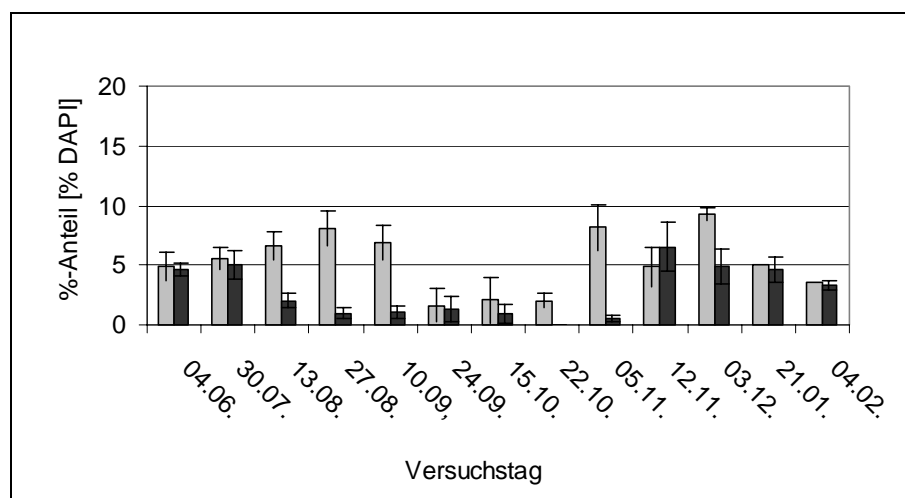


Abbildung 5.40: Anteil der mit der Sonde Sna23a hybridisierten Bakterien an der Gesamtzellzahl (□ A/O-Anlage, ■ Phoredox-Anlage)

Im Gegensatz zu den genannten Organismen waren Bakterien, die mit den Sonden Hha23a und MNP1 hybridisierten, nur in einzelnen Proben detektierbar und dann nur in sehr geringer Anzahl. Dies gilt auch für Typ 021N (γ -Proteobakterien), der häufig in hoch belasteten Anlagen auftritt. Die geringen prozentualen Anteile der mittels FISH quantifizierten γ -Proteobakterien bestätigen dieses Ergebniss. Aufgrund dieser Ergebnisse muss für diese fadenförmigen Bakterien von einer untergeordneten Abundanz bzw. von Einzelfunden ausgegangen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In Deutschland werden ca. 93% des Abwassers (Stand 2001) in zentralen Kläranlagen mittels biologischer Behandlungsverfahren gereinigt. Das entspricht einem Volumen von ca. 10,5 Mrd. $\text{m}^3 \text{a}^{-1}$. Gesetzliche Auflagen für die Elimination eutrophierender Nährstoffe führten zu erheblichen technischen Nach- und Umrüstungen der Kläranlagen. Zudem ist eine stetige Optimierung der biologischen Verfahren im Hinblick auf Effizienz und Stabilität erforderlich, für die eine Kenntnis der daran beteiligten Organismen unbedingt erforderlich ist. Dies gilt insbesondere für die an der biologischen Phosphatelimination beteiligten Bakterien, über die trotz umfangreicher Forschung bisher wenig bekannt ist.

Entsprechend der Zielstellung der Arbeit wurden zwei Belebtschlammanlagen im Labormaßstab mit kommunalem Abwasser betrieben. Als Verfahren wurden zwei Hauptstromverfahren zur biologischen Phosphatelimination, das A/O- und das Phoredox-Verfahren, gewählt. Da nur in der Phoredox-Anlage eine Stickstoffelimination erfolgte, konnten durch die Wahl dieser Verfahren die mikrobiellen Strukturen der Belebtschlämme in Abhängigkeit von der parallelen Nitrifikation untersucht werden.

Für beide Versuchsanlagen wurde in dem Untersuchungszeitraum von 8 Monaten eine stabile Elimination von Phosphat, BSB_5 und CSB erreicht. Die Ablaufkonzentrationen lagen im Mittel unterhalb der Grenzwerte für Kläranlagen der Größenklasse 4. Die Phoredox-Anlage erfüllte zudem die Grenzwerte für Ammonium- und Gesamtstickstoff.

In diesem Zeitraum war die Phosphatfreisetzung im Anaerobbecken der Phoredox-Anlage mit ca. $24 \text{ mg PO}_4\text{-P l}^{-1}$ im Durchschnitt etwas höher als in der A/O-Anlage (ca. $17 \text{ mg PO}_4\text{-P l}^{-1}$). Dies entspricht Freisetzungsraten von ca. $5,2 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$ (Phoredox-Anlage) bzw. $2,8 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$ (A/O-Anlage). Ursache für diese größere P-Freisetzung in der Phoredox-Anlage ist die längere Verweilzeit des Belebtschlammes im Anaerobbecken. In den Batch-Versuchen zur P-Freisetzung wurden für beide Anlagen vergleichbare Werte (10 bzw. $12 \text{ PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ TS}$) ermittelt.

Die mikrobielle Charakterisierung der Belebtschlammbiozöten erfolgte mit drei unterschiedlichen molekularbiologischen, d.h. kultivierungsunabhängigen, Methoden. Dies waren die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), die terminale Restriktionsanalyse (T-RFLP) und die Erstellung von 16S rDNA-Bibliotheken. Für eine bessere Beurteilung der Ergebnisse aus den Versuchsanlagen wurden zusätzlich drei kommunale Kläranlagen in die Untersuchungen aufgenommen. Diese unterschieden sich sowohl hinsichtlich ihrer verfahrenstechnischen Parameter als auch in der Zusammensetzung des Rohabwassers.

Bei der Fluoreszenz *in situ* Analyse konnten mit der universellen Oligonukleotidsonde EUB338-I in den Belebtschlammern der beiden Versuchsanlagen ca. 75-80% der mit DAPI gefärbten Bakterien detektiert werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Detektierbarkeit von der Temperatur des Abwassers und von der Schlammbelastung der untersuchten Anlagen.

Auf Gruppenniveau besaßen die Versuchsanlagen trotz der unterschiedlichen Verfahrensführung eine sehr ähnliche mikrobielle Zusammensetzung. In den Belebtschlammern dominierten Vertreter der β -Gruppe der Proteobakterien mit einem prozentualen Anteil von 21%. Die α -Gruppe der Proteobakterien, die HGC-Gruppe und das Cytophaga-Flavobakterien-Cluster besaßen einen Anteil von ca. 12-16%. Diese Angaben stellen Durchschnittswerte von 15 Analysen dar. Es traten jedoch im Verlauf der Untersuchungen deutliche Veränderungen in der Abundanz einzelner Gruppen auf. Diese waren in der A/O-Anlage, der Anlage mit dem kleineren Schlammalter, etwas stärker ausgeprägt und betrugen bis zu 50% der mittleren Abundanz. Die Veränderungen der Abundanz der β -Gruppe der Proteobakterien konnte zum Teil durch die Abundanz fadenförmiger Bakterien der Gattung *Sphaerotilus natans* erklärt werden.

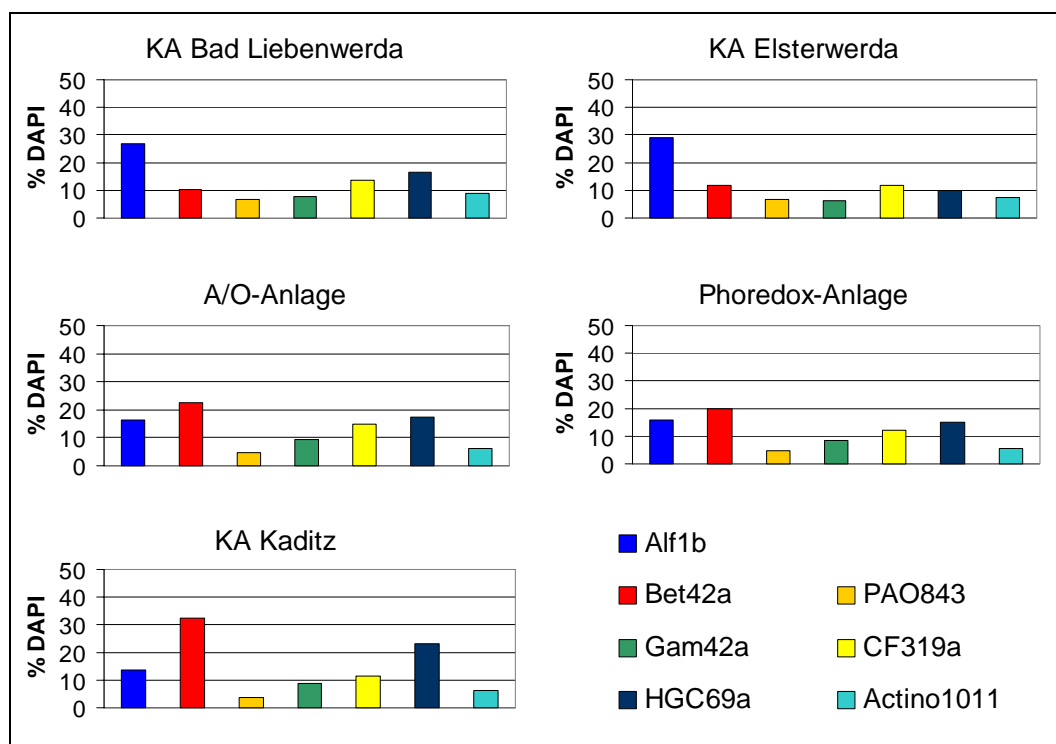


Abbildung 6.1: Mikrobielle Zusammensetzung der untersuchten Anlagen auf Grundlage der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Biozönose der KA Kaditz, eine hochbelastete Anlage ohne erhöhte biologische Phosphat- und Stickstoffelimination, besaß auf Gruppenniveau eine ähnliche mikrobielle Zusammensetzung wie die der Versuchsanlagen. Auch dieser Belebtschlamm wurde von Bakterien der β -Gruppe der Proteobakterien dominiert (32%). Dagegen konnte für die Belebtschlämme der Kläranlagen Bad Liebenwerda und Elsterwerda, den Anlagen mit hohem Schlammalter, eine Dominanz der α -Proteobakterien (ca. 27%) festgestellt werden. Die β -Gruppe der Proteobakterien war in diesen Biozönosen mit nur ca. 10% vertreten. Die anderen taxonomischen Gruppen besaßen prozentuale Anteile zwischen 7-12%.

Mit den spezifischen Oligonukleotidsonden für Phosphat speichernde Bakterien aus der *Rhodocyclus*-Gruppe (Sonde Pao843) bzw. der Gattung *Tetrasphaera* (Sonde Actino1011) konnten in allen Anlagen Bakterien detektiert werden. In der KA Kaditz, der Anlage ohne biologische Phosphatelimination, wurden für die *Rhodocyclus*-Gruppe mit ca. 4% die kleinsten prozentualen Anteile ermittelt. Die Gattung *Tetrasphaera* war in dieser Anlage mit ca. 6% vertreten. In den Versuchsanlagen besaßen beide Gruppen einen Anteil von ca. 5-6%. Dagegen konnten in den kommunalen Anlagen mit hohem Schlammalter (KA Bad Liebenwerda und KA Elsterwerda) mit >7% deutlich höhere Anteile für diese Bakterien gefunden werden. Da diese Bakteriengruppen in allen Anlagen, d.h. auch in der Anlage ohne biologische Phosphatelimination, vertreten waren, ist davon auszugehen, dass sie zur „natürlichen“ Biozönose von Belebtschlammssystemen gehören und aufgrund der Verfahrensweise der Anlagen ihren Metabolismus verändern. Ebenfalls konnte in allen Anlagen die Gattung *Acinetobacter* mit Hilfe der spezifischen Sonde Aca23 nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil betrug jedoch nur 1-4%.

Da in den untersuchten Anlagen der prozentuale Anteil der *Rhodocyclus*-Gruppe bzw. der Gattung *Tetrasphaera* unter 10% lag, deutet es darauf hin, dass in diesen Anlagen keine dieser Bakteriengruppen alleine für die erhöhte Phosphorspeicherung verantwortlich ist. Durch die Berechnung einer spezifischen P-Freisetzung auf Grundlage der ermittelten P-Freisetzung (10 bzw. 12 mg $\text{PO}_4\text{-P g}^{-1}$ TS) und der Abundanz der beiden untersuchten Gruppen konnte dies bestätigt werden. Die spezifische P-Freisetzung betrug bezogen auf eine Abundanz von 10% ca. 250-300 mg $\text{PO}_4\text{-P g}^{-1}$ oTS. Bei einem natürlichen Phosphatgehalt von ca. 3% in Bakterienzellen entspricht die P-Freisetzung einem Phosphatgehalt von >280 mg $\text{PO}_4\text{-P g}^{-1}$ oTS in der aeroben Phase. Dieser Wert liegt deutlich über den Werten bisheriger Literaturangaben über Gesamtposphatgehalte von Belebtschlammisolaten.

Ammonium oxidierende Bakterien konnten mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ebenfalls in beiden Versuchsanlagen, d.h. auch in der A/O-Anlage ohne Nitrifikation, nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil betrug im Durchschnitt 3,4% in der A/O-Anlage bzw. 4,8% in der Phoredox-Anlage. Das Vorkommen dieser physiologischen Gruppe in der A/O-Anlage konnte mit Hilfe der *amoA*-spezifischen PCR bestätigt werden. In beiden Anlagen dominierten Vertreter des *Nitrosomonas*-Clusters, jedoch besaß die *amoA*-Genbibliothek der Phoredox-Anlage eine höhere Diversität. Die *amoA*-Sequenzen der A/O-Anlage gruppieren dagegen zu zwei Sequenzen, die aus einem anoxischen Biofilm isoliert wurden.

In der Gruppe der fadenförmigen Bakterien dominierte *Microthrix parvicella* im gesamten Untersuchungszeitraum. Daneben trat die Gattung *Sphaerotilus natans* untergeordnet auf. Ihr prozentualer Anteil schwankte zwischen 2% bis 9%. Andere Gattungen, wie z.B. die nocardioformen Actinomyceten, *Haliscomenobacter hydrossis* und Typ 021N, traten nur als Einzelfunde auf.

Die T-RFLP-Analyse der Belebtschlämme erfolgte mit zwei Restriktionsenzymen, *MspI* und *RsaI*. Auch bei diesen Untersuchungen besaßen die Belebtschlämme der beiden Versuchsanlagen eine sehr ähnliche Zusammensetzung. Die Restriktionsprofile beider Anlagen wurden durch die gleichen Fragmentlängen dominiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung war die mikrobielle Struktur des Belebtschlammes der KA Kaditz sehr ähnlich zu jener der Versuchsanlagen. Dagegen konnten für die beiden kommunalen Kläranlagen mit dem hohen Schlammalter deutliche Unterschiede zu den Versuchsanlagen aber auch zueinander festgestellt werden. Zum einen konnten in den Restriktionsprofilen Veränderungen in der Häufigkeit einzelner Fragmentlängen festgestellt werden, zum anderen traten neue Fragmente in den Profilen dieser Anlagen auf.

Da viele Gattungen bzw. Spezies bei einem Verdau mit den eingesetzten Enzymen ähnliche Fragmentlängen aufweisen, konnten den einzelnen Fragmentlängen der Restriktionsprofile keine Bakteriengattungen zugeordnet werden. Auch der Vergleich der beiden Restriktionsprofile erbrachte aufgrund der großen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten der dominierenden und untergeordneten Fragmentlängen keine bessere taxonomische Zuordnung.

Dagegen traten im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der T-RFLP-Analyse deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken der unterschiedlichen Anlagen auf. Für die Beurteilung der Versuchsanlagen wurden 141 Klone analysiert, deren Sequenzen 84 verschiedenen OTUs (Operational Taxonomic Units) zugeordnet wurden. Nur 11 dieser 84 OTUs waren in beiden Bibliotheken vertreten. Nach Kalkulation (nach CHAO, 1984) der maximalen Anzahl an OTUs auf Basis der bisher analysierten Sequenzen muss von einer deutlich höheren Diversität in der Genbibliothek der A/O-Anlage (ca. 200 OTUs) im Vergleich zur Phoredox-Anlage (ca. 110 OTUs) ausgegangen werden.

Auch auf Gruppenniveau traten deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen der Fluoreszenz *in situ* Analyse auf. Die Genbibliotheken der Versuchsanlagen wurden durch Sequenzen der HGC-Gruppe und der α -Gruppe der Proteobakterien dominiert. Die β -Gruppe der Proteobakterien, die die Belebtschlamm-biozönosen auf Grundlage der Fluoreszenz *in situ* Analyse dominierten (ca. 21%), sind in den Genbibliotheken stark unterrepräsentiert (ca. 7%). Dies erklärt auch, dass nur 2 Sequenzen aus der *Rhodocyclus*-Gruppe in den Genbibliotheken enthalten sind. Sequenzen von Ammonium oxidierenden Bakterien traten in den Genbibliotheken nicht auf. Dagegen konnten 14 Sequenzen der Gattung *Tetrasphaera* zugeordnet werden, einer Gruppe möglicher Phosphat speichernder Bakterien.

Vergleichbar zu den Ergebnissen der Versuchsanlagen konnten auch für die Genbibliotheken der kommunalen Kläranlagen deutliche Unterschiede zu den Fluoreszenz *in situ* Analysen nachgewiesen werden. In den Genbibliotheken dominierten ebenfalls Sequenzen der α -Gruppe

der Proteobakterien bzw. der HGC-Gruppe. Die β -Gruppe der Proteobakterien war nur durch eine Sequenz in der Genbibliothek der KA Kaditz vertreten. Nur drei der 87 Sequenzen waren in mehr als einer Genbibliothek der kommunalen Kläranlagen vertreten. Aufgrund der geringeren Anzahl an analysierten Sequenzen (ca. 30 pro Anlage) sind jedoch Aussagen über Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Bibliotheken bzw. die maximale Anzahl an OTUs nur begrenzt möglich.

Auch in der Ähnlichkeit der enthaltenen Sequenzen zu den Sequenzen der NCBI-Datenbank traten deutliche Unterschiede zwischen den Genbibliotheken der einzelnen Anlagen auf. So besaßen in der Genbibliothek der KA Kaditz ca. 66% der Sequenzen eine Ähnlichkeit $>97\%$ zu bekannten Sequenzen, in der Bibliothek der KA Elsterwerda ca. 50%. Dagegen konnten nur ca. 35% der Sequenzen der Bibliotheken der Versuchsanlagen und der KA Bad Liebenwerda bekannten Sequenzen mit dieser Bestimmtheit zugeordnet werden. Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Sequenzen betrachtet, die nur eine geringe Ähnlichkeit ($<90\%$) zu bekannten Sequenzen besitzen.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse in Abhängigkeit von den verwendeten Analyseverfahren zeigen sich deutliche Unterschiede. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bietet die Möglichkeit Populationen „in situ“, d.h. kultivierungsunabhängig, zu untersuchen. Dies ermöglicht eine quantitative Analyse der mikrobiellen Population und in Kombination mit der konfokalen Laserskanningmikroskopie die Aufklärung räumlicher Strukturen.

Jedoch wird die Charakterisierung von artenreichen Biozöosen, wie z.B. Belebtschlamm, auf Speziesniveau durch die große Zahl Oligonukleotidsonden, die für eine genaue Differenzierung benötigt werden, begrenzt. Dagegen lassen sich physiologische Gruppen und dominierende Spezies bzw. Gattungen z.T. sehr gut quantifizieren. Auf Gruppenniveau ist die Differenzierung ähnlicher Biozöosen, wie z.B. die unterschiedlichen Belebtschlämme, nur bedingt möglich. So lassen sich zeitliche Veränderungen in der Abundanz einzelner Taxa innerhalb der phylogenetischen Gruppen nicht verfolgen. Ein weiteres Problem der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung stellt die unterschiedliche Permeabilität der verschiedenen Zellwandtypen für die Oligonukleotidsonden dar. So ist für einige Gattungen der GRAM-positiven Bakterien, wie z.B. den nocardioformen Actinomyceten oder *Microthrix parvicella*, bekannt, dass sie ohne eine enzymatische Vorbehandlung nicht detektiert werden können.

Die hohe mikrobielle Diversität der Belebtschlämme stellte auch bei der taxonomischen Auswertung der T-RFLP-Ergebnisse ein Problem dar. Die verwendeten Enzyme schneiden aufgrund ihrer Erkennungssequenz die PCR-Produkte auf taxonomischer Ebene relativ unspezifisch, daher besitzen viele Mikroorganismen unterschiedlicher Taxa ähnliche Fragmentlängen. Dies führte dazu, dass in den T-RFLP-Profilen nur wenige Fragmentlängen dominierten. Auch der Einsatz von zwei Restriktionsenzymen (*RsaI* und *MspI*) ermöglichte aufgrund der großen Anzahl an Kombinationen der unterschiedlichen Fragmentlängen keine Zuordnung einzelner Fragmente zu Bakteriengattungen. Zudem ist eine quantitative Aussage zum Auftreten einzelner Fragmente anhand der Peakhöhe aufgrund der vorgeschalteten PCR nicht zulässig.

Für eine Nutzung dieser Methode zur Charakterisierung heterogener Biozönosen ist zum einen eine größere Zahl an Restriktionsenzymen erforderlich. Zum anderen könnte diese Technik in Kombination mit einer spezifischen PCR für physiologische oder taxonomische Gruppen eingesetzt werden. Dies könnte eine spezifischere Auswertung der Restriktionsprofile ermöglichen.

Unter der Annahme, dass die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung die Populationsstruktur am besten wiedergibt, wurden die systematischen Fehler PCR-basierter Verfahren im Rahmen dieser Arbeit sehr deutlich. So gab es signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der 16S rDNA-Bibliotheken im Vergleich zu den Ergebnissen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Trotzdem besitzen die 16S rDNA-Bibliotheken detaillierte taxonomische Informationen, die durch den Einsatz anderer Verfahren nicht gewonnen werden können. In Kombination mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist die Erstellung von Genbibliotheken eine der wichtigsten Techniken für die Analyse unbekannter Populationsstrukturen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abwasserverordnung, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2002 (15.10.2002), Teil 1, Nr. 74

ALARCON G.O. (1961) Removal of phosphorus from sewage. Master's essay, The John Hopkins Univ., Baltimore, Md., 1961.

ALLAN R.A. & MILLER J.J. (1980) Influence of S-adenosyl-methionine on 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. *Can. J. Microbiol.* 26: 912-920.

AMANN R.I., KRUMHOLZ L. & STAHL D.A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172(2): 762-770.

AMANN R.I. & LUDWIG W. (1994) Typing *in situ* with probes. In: PRIEST F.G., RAMOS-CORMENZANA A. & TINDALL B. (eds.), *Bacterial Diversity and Systematics*, Plenum Press, New York, 115-135.

AMANN R.I., LUDWIG W. & SCHLEIFER K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1):143-169.

AMANN R.I. (1995) Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* 4: 543-554.

AMANN R., SNAIDR J., WAGNER M., LUDWIG W. & SCHLEIFER K.-H. (1996) *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* 178(12): 3496-500.

ANDREASEN K. & NIELSEN P.H. (1998) *In situ* characterisation of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5):19-26.

ARUN V., MINO T. & MATSUO T. (1988) Biological mechanism of acetate uptake mediated by carbohydrate consumption in excess phosphorus removal systems. *Wat. Res.* 22(5): 565-570.

ARVIN E. & KRISTENSEN G.H. (1985) Exchange of organics, phosphate and cations between sludge and water in biological phosphorus and nitrogen removal processes. *Wat. Sci. Tech.* 17: 147-162.

AULING G., PILZ F., BUSSE H.J., KARRASCH S., STREICHAN M. & SCHÖN G. (1991) Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12): 3585-3592.

Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung, Bd. 1: Chemische, physikalisch-chemische und physikalische Methoden. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena (1980).

BALOWS A., TRÜPER H.G., DWORKINS M., HARDER W. & SCHLEIFER K.-H. (Eds.) (1992) *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.

- BARNARD J.L. (1976) A review of biological removal in the activated sludge process. *Water SA* 2: 136-144.
- BARTOSCH S., WOLGAST I., SPIECK E. & BOCK E. (1999) Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Envir. Microbiol.* 65(9): 4126-4133.
- BEACHAM A.M., SEVIOUR R.J., LINDREA K.C. & LIVINGSTON I. (1992) Genospecies diversity of acinetobacter isolates obtained from a biological nutrient removal pilot plant of a modified uct configuration. *Wat. Res.* 24(1) : 23-29.
- BEIMFOHR C., KRAUSE A., AMANN R., LUDWIG W. & SCHLEIFER K.-H. (1993) *In situ* identification of lactococci, enterococci and streptococci. *Sys. Appl. Microbiol.* 16: 450-456.
- BJÖRNSSON L., HUGENHOLTZ P., TYSON G.W. & BLACKALL L.L. (2002) Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiol.* 148: 2309-2318.
- BLACKALL L.L., SEVIOUR E.M., BRADFORD D., ROSSETTI S., TANDOI V. & SEVIOUR R.J. (2000) 'Candidatus Nostocoida limicola', a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50(2): 703-709.
- BOCK E., KOOPS H.-P., HARMS H. & AHLERS B. (1991) The biochemistry of nitrifying organisms. In: SHIVELY J.M. & BARTON L.L. (eds.), *Variations in Autotrophic Life*. Academic Press, London, 171-200.
- BOCK E. & KOOPS H.-P. (1992) The genus *Nitrobacter* and related genera. In: BALOWS A., TRÜPER H.G., DWORKINS M., HARDER W. & SCHLEIFER K.-H. (eds.), *The Procaryotes*. Springer Verlag, New York, Vol.III: 2302-2309.
- BOLL R. (1988) Zur erhöhten biologischen Phosphorentfernung mit dem Belebungsverfahren. Veröffentlichungen des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft der TU Braunschweig, Bd. 46.
- BOND P.L., HUGENHOLTZ P., KELLER J. & BLACKALL L.L. (1995) Bacterial community structure of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5): 1910-1916.
- BOND P.L., ERHART R., WAGNER M., KELLER J. & BLACKALL L.L. (1999) Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non efficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9): 4077-4084.
- BRODISCH K.E.U. (1985) Interaction of different groups of microorganisms in biological phosphate removal. *Wat. Sci. Tech.* 17: 89-97.
- BRUCE D. (1998) Analysis of mer Gene Subclasses within Bacterial Communities in Soils and Sediments Resolved by Fluorescent-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Appl. Envir. Microbiol.* 63: 4914-4919.

- BUCHAN L. (1981) The location and nature of accumulated phosphorus in seven sludges from activated sludge plants which exhibited enhanced phosphorus removal. *Water SA* 7: 1-7.
- BUCHAN L. (1983) Possible biological mechanism of phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* 15: 87-103.
- BURRELL P.C., PHALEN C.M. & HOVANEC T.A. (2001) Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12): 5791-800.
- CHAO A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian J. Stat.* 11:265-270.
- CHRISTENSSON M., BLACKALL L.L. & WELANDER T. (1998) Metabolic transformations and characterisation of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49(2): 226-234.
- CLOETE T. E. & STEYN P. L. (1988) The role of *Acinetobacter* as a phosphorus removing agent in activated sludge. *Water Research* 22(8): 971-976.
- COMEAU Y., HALL K.J., HANCOCK R.E.W. & OLDHAM W.K. (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat. Res.* 20:1511-1521.
- COMEAU Y., OLDHAM W.K. & HALL K.J. (1987) Dynamics of carbon reserves in biological dephosphatation of wastewater. *Advance in Water Pollution Control, Biological Phosphate Removal from Wastewaters, Proc. Of an IAWPRC specialized Conference, Sept. 1987, Rome:* 39-55.
- CROCETTI G.R., HUGENHOLTZ P., BOND P.L., SCHULER A., KELLER J., JENKINS D. & BLACKALL L.L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3):1175-1182.
- CRYER D.R., ECCLESHALL R. & MARMUR J. (1975) Isolation of Yeast DNA. In: PRESCOTT D.M. (ed.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, New York, 12: 39-44.
- DABERT P., SIALVE B., DELGENES J.P., MOLETTA R. & GODON J.J. (2001) Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55(4): 500-509.
- DAIMS H., BRÜHL A., AMMAN R. & SCHLEIFER K.-H. (1998) The domain-specific probe EUB is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Sys. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.
- DAIMS H. (2001) Population structure and functional analysis, by *in situ* techniques, of nitrifying bacteria in wastewater treatment plants, Dissertation, TU München.
- DEINEMA M.H., HABETS L.H.A., SCHOLTEN J., TURKSTA E. & WEBERS H.A.A.M. (1980) The accumulation of polyphosphate in *Acinetobacter* spp.. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:275-279.
- DELONG E. F., WICKHAM G. S. & PACE N. R. (1989) Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV). Physikalische, chemische und bakteriologische Verfahren. Beuth Verlag GmbH.

DEVEREUX R., KANE M. D., WINFREY J. & STAHL D. A. (1992) Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 15 : 601-609.

DOLLHOPF S.L., HASHSHAM S.A., DAZZO F.B., HICKEY R.F., CRIDDLE C.S. & TIEDJE J.M. (2001) The impact of fermentative organisms on carbon flow in methanogenic systems under constant low-substrate conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3-4):531-538.

EIKELBOOM D.H. & VAN BUIJSEN H.J.J. (1983) Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung. F. Hirthammer Verlag München.

ERHART R. (1994) Molekulargenetische Identifizierung der Gattung *Acinetobacter* und ihr Nachweis *in situ*. Diplomarbeit, TU München.

FELSKE A., RHEIMS H., WOLTERINK A., STACKEBRANDT E., AKKERMANS A.D. (1997) Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology.* 143(9):2983-2989.

FRIEDRICH U., NAISMITH M.M., ALTENDORF K., LIPSKI A. (1999) Community analysis of biofilters using fluorescence *in situ* hybridization including a new probe for the *Xanthomonas* branch of the class Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8):3547-3554.

FUHS G.W. & CHEN M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb. Ecol.* 2: 119-138.

GICH F., GARCIA-GIL J., OVERMANN J. (2001) Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Microbiol.* 177: 1-10.

GIESEKE A, PURKHOLD U, WAGNER M, AMANN R & SCHRAMM A. (2001) Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(3):1351-62.

GRIEPENBURG U., WARD-RAINEY N., MOHAMED S., SCHLESNER H., MARXSEN H., RAINEY F.A., STACKEBRANDT E. & AULING G. (1999). Phylogenetic diversity, polyamine pattern and DNA base composition of members of the order Planctomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(2): 689-696.

HAROLD F.M. (1966) Enzymic and genetic control of polyphosphate accumulation in *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 35: 81-90.

HAROLD F.M., HAROLD R.L. & ABRAMS A. (1965) A mutant of *Streptococcus faecalis* defective in phosphate uptake. *J. Biol. Chem.* 240: 3145-3153.

HEAD I.M., SAUNDERS J.R. & PICKUP R.W. (1998). Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultured microorganisms. *Microb. Ecol.* 35: 1-21.

- HELMER C. (1994) Einfluß von Temperatur und Stoßbelastungen auf die Mikroflora der belebten Schlämme in Bio-P-Anlagen. Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover (Heft 89).
- HELMER C. & KUNST S. (1998) Low temperature effects on phosphorus release and uptake by microorganisms in EBPR plants. *Wat. Sci. Technol.* 37(4-5): 531–539.
- HENZE M., HARREMOËS P., LA COUR JANSEN J. & ARVIN E. (1997). *Wastewater Treatment - Biological and Chemical Processes*. 2.Edition, Springer Verlag Berlin.
- HESELNANN R.P., WERLEN C., HAHN D., VAN DER MEER J.R. & ZEHNDER A.J.B. (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 22(3):454-465.
- HEYMANN J.B., EAGLE L.M., GREBEN H.A. & POTGIETER D.J.J. (1989) The isolation and characterisation of volutin granules as subcellular components involved in biological phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* 21: 397-408.
- HILL T.C.J., WALSH K.A., HARRIS J.A. & MOFFETT B.F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43(1): 1-11.
- HIRAISHI A. & MORISHIMA M.Y. (1990) Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated sludge showing enhanced phosphate removal. *J. Ferment. Bioeng.* 69(6): 368-371.
- HORZ H.P., ROTTHAUWE J.H., LUKOW T. & LIESACK W. (2000) Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Methods* 39(3):197-204.
- HORZ H.P., YIMGA M.T. & LIESACK W. (2001) Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9):4177-4185.
- IKUTA H., NODA N., EBIE Y., HIRATA A., TSUNEDA S., MATSUMURA M. & INAMORI Y. (2000) The rapid quantification and detection of nitrifying bacteria by using monoclonal antibody method *Wat. Sci. Technol.* 42 (3-4): 1–7.
- JETTEN, M.S.M., STROUSA M., VAN DE PAS-SCHOONENA K. T., SCHALKA J., VAN DONGENA U.G.J.M., VAN DE GRAAFA A.A., LOGEMANNA S., MUYZERB G., VAN LOOSDRECHTA M.C.M. & KUENEN J.G. (1998). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* 22 (5): 421-437.

- JETTEN M.S.M., SCHMID M., SCHMIDT I., WUBBEN M., VAN DONGEN U., ABMA W., SLIEKERS O., REVSBECH N.P., BEAUMONT H.J.E., OTTOSEN L., VOLCKE E., LAANBROEK H.J., CAMPOS-GOMEZ J.L., COLE J., VAN LOOSDRECHT M., MULDER J.W., FUERST J., RICHARDSON D., VAN DE PAS K., MENDEZ-PAMPIN R., THIRD K., CIRPUS I., VAN SPANNING R., BOLLMANN A., NIELSEN L.P., OP DEN CAMP H., SCHULTZ C., GUNDERSEN J., VANROLLEGHEM P., STROUS M., WAGNER M. & KUENEN J.G. (2002) Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology* 1: 51-63.
- JUNI E. (1978) Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 349-371.
- JURETSCHKO S., TIMMERMAN G., SCHMID M., SCHLEIFER K.-H., POMMERENING-ROSER A., KOOPS H.P. & WAGNER M. (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8): 3042-3051.
- KALMBACH S., MANZ W. & SZEWZYK U. (1997) Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. *FEMS Micro. Ecol.* 22: 265-279.
- KÄMPFER P., ERHART R., BÖHRINGER C., WAGNER M. & AMANN R. (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* 32:101-121.
- KAWAHARASAKI M., TAKAHIRO K., TANAKA H., NAKAMURA K. (1998) Development and application of 16s rRNA-targeted oligonucleotide probe for detection of phosphate-accumulating bacterium *Microlunatus phosphorus* in the enhanced biological phosphorus removal process. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5): 481-484.
- KOHNO T., SEI K. & MORI K. (2002) Characterization of type 1851 organism isolated from activated sludge samples. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2): 111-114.
- KOOPS H.P., BÖTTCHER B., MÖLLER U.C., POMMERENING-RÖSER A. & STEHR G. (1991) Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov.. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1689-1699.
- KOOPS H.-P. & POMMERENING-RÖSER A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37(1): 1-9.
- KULAEV I.S. (1979) The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley and Sons, Chichester: 36-66.
- KULAEV I.S. & VAGABOV V.M. (1983) Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 24: 83-171.

- KUNST S. (1991) Untersuchungen zur biologischen Phosphorelimination in Hinblick auf ihre abwassertechnische Nutzung. Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover (Heft 77).
- KUNST S., HELMER C. & KNOOP S. (2000) Betriebsprobleme auf Kläranlagen durch Blähschlamm, Schwimmschlamm, Schaum. Handbuch zur Identifizierung und Bekämpfung fädiger Bakterien. Springer Verlag
- LARSEN N., OLSEN G.J., MAIDAK B.L., MCCAUGHEY M.J., OVERBEEK R., MACKE T.J., MARSH T.L. & WOESE C.R. (1993) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 21: 3021-3023.
- LAWSON E.N. & TONHAZY N.E. (1980) Change in morphology and phosphate uptake patterns of *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Water SA* 6: 105-112.
- LEE N., NIELSEN P.H., ANDREASEN K., JURETSCHKO S., NIELSEN J.L., SCHLEIFER K.-H. & WAGNER M. (1999) Combination of fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3): 1289-1297.
- LEE N., JANSEN J.C., ASPEGREN H., HENZE M., NIELSEN P.H. & WAGNER M. (2002) Population dynamics in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Wat. Sci Tech.* 46(1-2):163-170.
- LEMMER H. (1996) Mikrobiologie und Ökologie - Was haben sie der Abwassertechnik zu bieten? In: LEMMER H., GRIEBE TH. & FLEMMING H.-C. (eds.), *Ökologie der Abwasserorganismen*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, Teil I: 3-12.
- LEVIN G.V. & SHAPIRO J. (1965) Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.* 37: 800-821.
- LISS E. & LANGEN P. (1960) Über hochmolekulares Polyphosphat der Hefe. *Biochem. Z.* 333:275-277
- LISS E. & LANGEN P. (1962) Versuche zur Polyphosphat-Überkompensation in Hefezellen nach Phosphatverarmung. *Arch. Microbiol.* 41:383-392
- LIU W.T. (1995) Function, dynamics and diversity of microbial population in anaerobic aerobic activated sludge processes for biological phosphate removal. Ph. D. thesis, University Tokyo.
- LIU W.T., MARSH T.L., CHENG H. & FORNEY L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11): 4516-4522.
- LIU W.T., LINNING K.D., NAKAMURA K., MINO T., MATSUO T. & FORNEY L.J. (2000) Microbial community changes in biological phosphate-removal systems on altering sludge phosphorus content. *Microbiol.* 146: 1099-1107.
- LIU W.T., NIELSEN A.T., WU J.H., TSAI C.S., MATSUO Y. & MOLIN S. (2001) *In situ* identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. *Environ. Microbiol.* 3(2):110-122.

- LLOBET-BROSSA E., ROSSELLÓ-MORA R. & AMANN R. (1998) Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(7): 2691-2696.
- LÖTTER L.H. & MURPHY M. (1985) The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge plant with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water SA* 11: 179-184.
- LUDWIG F. (2002) Untersuchung komplexer mikrobieller Gemeinschaften im Talsperrensediment mittels molekularer Fingerprint-Techniken. Diplomarbeit, TU-Dresden.
- LURIA S.E. (1960) The bacterial protoplasm: composition and organization. In: GUNSALUS J.C. & STANIER R.Y. (eds.), *The Bacteria*. Academic Press, London New York, Vol.1: 1-34.
- MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., WAGNER M., SCHLEIFER KH. (1992) Phylogenetic oligonucleotide probes for the mayor subclass of *Proteobacteria*: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., VANCANNEYT M. & SCHLEIFER K.-H. (1994) In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 28: 1715-1723.
- MARAIS G.V.R., LOEWENTHAL R.E. & SIEBERITZ I.P. (1983) Reviews : Observations supporting phosphorus removal by biological excess uptake. *Wat. Sci. Tech.* 15: 15-41.
- MARCHESI J.R., SATO T., WEIGHTMAN A.J., MARTIN T.A., FRY J.C., HIOM S.J., DYMCK D. & WADE W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 795-799.
- MARMUR J. (1961) A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- MARSH T.L., SAXMAN P., COLE J. & TIEDJE J. (2000) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8): 3616-3620.
- MASZENAN A.M., SEVIOUR R.J., PATEL B.K.C., SCHUMANN P., BURGHARDT J., WEBB R.I., SODDELL J.A. & REES G.N. (1999) *Friedmanniella spumicola* sp. nov. and *Friedmanniella capsulata* sp. nov. from activated sludge foam: GRAM-positive cocci that grow in aggregates of repeating groups of cocci. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1667-1680.

- MASZENAN A.M., SEVIOUR R.J., PATEL B.K.C., SCHUMANN P., BURGHARDT J., TOKIWA Y. & STRATTON H.M. (2000) Three isolates of novel polyphosphate-accumulating GRAM-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50:593-603
- MINO T., ARUN V., TSUZUKI Y. & MATSUO Y. (1984) Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In: RAMADORI, R. (ed.), *Biological Phosphate Removal from Wastewaters*. Pergamon Press, 27-38.
- MINO T., VAN LOOSDRECHT M.C.M. & HEIJEN J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphat removal process. *Wat. Res.* 32(11): 3193-3207.
- MINO T. (2000) Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry* 65(3):341-8.
- MIYA A., KITAGAWA M. & TANAKA T. (1987) The behavior of magnesium in biological phosphate removal. *Advance in Water Pollution Control, Biological Phosphate Removal from Wastewaters*, Proc. Of an IAWPRC specialized Conference, Sept. 1987, Rome: 134-147.
- MOBARRY B.K., WAGNER M., URBAIN V., RITTMANN B.E. & STAHL D.A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* 62: 2156-2162.
- MUDALY D.D., ATKINSON B.W. & BUX F. (2001) 16S rRNA in situ probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal. *Wat. Sci. Tech.* 43(1):91-98.
- MUDRACK K. & KUNST S. (1991) *Biologie der Abwasserreinigung*. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York.
- MUYZER G., DE WAAL E.C. & UITTERLINDEN A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3): 695-700.
- MUYZER G. (1999) Genetic fingerprinting of microbial communities – present and future perspectives. *Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Bell C.R., Brylinsky M. and Johnson-Green (ed.) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- NAKAMURA K., MASUDA K. & MIKAMI E. (1991) Isolation of a new type of polyphosphate accumulating bacterium and its phosphate removal characteristics. *J. Ferment. Bioeng.* 71: 258-263.

- NAKAMURA K., HIRAISHI, A., YOSHIMI, Y., KAWAHARASAKI, M., MASUDA, K. & KAMAGATA, Y (1995) *Microlunatus phosphovor* gen. nov., sp. nov., a new GRAM-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1):17-22.
- NEEF A., AMANN R.I., SCHLESNER H. & SCHLEIFER K.-H. (1998) Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144: 3257-3266.
- NEEF A., AMANN R.I., SCHLESNER H. & SCHLEIFER K.-H. (1998) The domain-specific probe EUB is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Sys. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.
- NIELSEN A.T., LIU W.T., FILIPE C., GRADY L. JR., MOLIN S. & STAHL D.A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3): 1251-1258.
- NODA N., IKUTA H., EBIE Y., HIRATA A., TSUNEDA S., MATSUMURA M., SUMINO T. & INAMORI Y. (2000) Rapid quantification and *in situ* detection of nitrifying bacteria in biofilms by monoclonal antibody method. *Wat. Sci. Tech.* 41(4-5): 301-308.
- ONUKE M., SATOH H. & MINO T. (2002) Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2): 145-154.
- PACE N. R., STAHL D. A., LANE D. L. & OLSEN G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbiol. Ecol.* 9: 1-55.
- PERNTHALER J., GLÖCKNER F. O., SCHÖNHUBER W. & AMANN R. (2001) Fluorescence *in situ* hybridization. In: PAUL J. (ed.) *Methods in Marine Microbiology*. Academic Press Ltd., London, 30: 207-226.
- PICKUP R.W. (1991) Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1009-1019.
- POMMERENING-RÖSER A., RATH G. & KOOPS H.-K. (1996) Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 344-351.
- PSENNER R., PUSKO R. & SAGER (1984) Die Fraktionierung organischer und anorganischer Phosphorverbindungen von Sedimenten. *Arch. Hydrobiol./ Suppl.* 70(1): 111-155.
- PURKHOLD U., POMMERENING-ROSER A., JURETSCHKO S., SCHMID M.C., KOOPS H.P. & WAGNER M. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5368-5382.
- REES G.N., VASILADIS G., MAY J.W. & BAYLY R.C. (1993) Production of poly- β -hydroxybutyrate in *Acinetobacter* spp. isolated from activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 734-737.

- RÖSKE I. (1987) Die vermehrte biologische Phosphorelimination bei Anwendung des Belebtschlammverfahrens. Habilitationsschrift, TU Dresden.
- RÖSKE I., BAUER H.-D. & UHLMANN D. (1989) Nachweis phosphorspeichernder Bakterien im Belebtschlamm mittels Elektronenmikroskopie und Röntgenspektroskopie. Gwf-wasser/abwasser 130: 73-75.
- RÖSKE I., SCHÖNBORN C. & FAUSTMANN S. (1993) Mitwirkung von Metallen bei der biologischen Phosphorelimination. Schriftenreihe des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft, Universität Karlsruhe, Bd. 68, Tagungsband der 7. Karlsruher Flockungstage: 73-91.
- RÖSKE I., UHLMANN D. & KERMER K. (1995) Anforderungen an kommunale Kläranlagen unter dem Gesichtspunkt der Gewässerbeschaffenheit. Korrespondenz Abwasser 42(3): 356-364.
- ROTHAUWE J.H., WITZEL K.P. & LIESACK W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Appl. Environ. Microbiol. 63(12): 4704-4712.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. & ERLICH H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467.
- SCHAAK F., BOSCHET A.F., CHEVALIER D., KERLAIN F. & SENELIER Y. (1985) Efficiency of existing biological treatment plants against phosphorus pollution. Techn. Sci. Municip. 80: 173-181.
- SCHADE M., BEIMFOHR C. & LEMMER H. (2002) Phylogenetic and physiological characterization of a "*Nostocoida limicola*"-like organism isolated from activated sludge. Wat. Sci. Tech. 46(1-2): 91-97.
- SCHAECHTER M., MAALØE O. & KJELDGAARD N.O. (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. 19: 592-606.
- SCHEER H. (1996) Empfehlung zur Durchführung und Auswertung von Phosphatrücklöse- und -aufnahmeversuchen. Gwf-Wasser/Abwasser 137(1): 12-22.
- SCHLEGEL H.G. (1997) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, George Thieme Verlag Stuttgart New York.
- SCHMIDT I. & BOCK E. (1997) Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Arch. Microbiol. 167: 106-111.

- SCHMID M., TWACHTMANN U., KLEIN M., STROUS M., JURETSCHKO S., JETTEN M., METZGER J. W., SCHLEIFER K.-H. & WAGNER M. (2000) Molecular Evidence for Genus-Level Diversity of Bacteria Capable of Catalyzing Anaerobic Ammonium Oxidation. *System. Appl. Microbiol.* 23: 93-106.
- SCHÖN G. & STREICHAN M. (1987) Mikrobiologische Grundlagen der biologischen Phosphatentfernung aus Abwasser. Veröff. des Inst. f. Stadtbauwesen, Technische Universität Braunschweig, Heft 42: 334-348.
- SCHÖN G. (1994) Biologische Phosphorentfernung bei der Abwasserreinigung im Belebungsverfahren. *Bio Engineering* 4:23-32.
- SCHÖNBORN C. (1998) Einfluß von Metallionen auf die Wechselwirkung zwischen biologischen und chemischen Prozessen bei der Phosphatelimination aus kommunalen Abwasser. Dissertation.
- SCHRAMM A., DE BEER D., VAN DEN HEUVEL H., OTTENGRAF S. & AMANN R. (1998) *In situ* structure/function studies in wastewater treatment systems. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5): 413-416
- SCHRAMM A., DE BEER D., VAN DEN HEUVEL J. C., OTTENGRAF S. & AMANN R. (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Appl. Envir. Microbiol.* 65(8): 3690-3696.
- SCHRAMM A. & AMANN R. (1999) Nucleic acid based techniques for analyzing the diversity, structure, and dynamics of microbial communities in wastewater treatment, *Biotechnology Environmental Processes*, 2nd edition: 85-108.
- SCHUPPLER M., WAGNER M., SCHON G. & GOBEL U.B. (1998) *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiol.* 144(1):249-259.
- SCHWOERBEL J. (1987) Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- SIDAT M., BUX F. & KASAN H.C. (1999) Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. *Water SA* 25(4): 175179.
- SMITH I.W., WILKONSON J.F. & DUGUID J.P. (1954) Volutin production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. *J. Bacteriol.* 68: 450-463.
- SNAIDR J., AMANN R., HUBER I., LUDWIG W. & SCHLEIFER K.-H. (1997) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7):2884-2896.
- SRINATH E.G., SASTRY C.A. & PILLAY S.C. (1959) Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge. *Experientia* 15: 339-340.
- STANTE L., CELLAMARE C.M., MALASPINA F., BORTONE G. & TILCHE A. (1997) Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamprospira* spp., *Wat. Res.* 31(6): 1317-1324.

- STOFFELS M., AMANN R., LUDWIG W., HEKMAT D. & SCHLEIFER K.-H. (1998) Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3): 930-938.
- STROUS M., FUERST J., KRAMER E.H.M., LOGEMANNA S., MUYZERB G., VAN DE PAS-SCHOONENA K.T., WEBB R., KUENEN J.G. & JETTEN, M.S.M. (1999). Missing lithotroph identified as new *planctomycete*. *Nature* 400: 446-449
- SUDIANA I.M., MINO T., SATOH H. & MATSUO T. (1998) Morphology *in situ* identification with rRNA targeted probe and respiratory quinone profile of enhanced biological and non enhanced biological phosphorous removal sludge. *Wat. Sci. Technol.* 38(8-9):69-79.
- SURESH N., WARBURG R., TIMMERMAN M., WELLS J., COCCIA M., ROBERTS M.F. & HALVORSON H.O. (1985) New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation. *Wat. Sci. Tech.* 17: 99-111.
- SUZUKI M.T. & GIOVANNONI S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625-630.
- SWAMINATHAN B. & MATAR G.M. (1993) Molecular typing methods. In: PERSING D.H., SMITH T.F., TENOVER F.C. & WHITE T.J. (eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 26-50.
- UHLMANN D. (1988) *Hydrobiologie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- UHLMANN D., RÖSKE I., HUPFER M. & OHMS G. (1990) A simple method to distinguish between polyphosphate and other phosphate fractions of activated sludge. *Wat. Res.* 24(11): 1355-1360.
- UHLMANN D. & HORN W. (2001) *Hydrobiologie der Binnengewässer*, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- VAN DER WAARDE J.J., GEURKINK B., HENSSEN M. & HEIJNEN G. (1998) Detection of filamentous and nitrifying bacteria in activated sludge with 16S rRNA probes, *Wat. Sci. Technol.* 37(4-5): 475-479.
- VAN GROENESTIJN J.W., BENTVELSEN M.M.A., DEINEMA M.H. & ZEHNDER A.J.B. (1989) Polyphosphate degrading enzymes in *Acinetobacter spp.* and activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:219-223.
- VAN LOOSDRECHT M.C.M., KUBA T. & HEIJNEN J.J. (1997) Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater, Use of dynamic enrichment cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 71 (1-2):109-116.
- VESTER F. & INGVORSEN K. (1998) Improved Most-Probable-Number Method To Detect Sulfate-Reducing Bacteria with Natural Media and a Radiotracer. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1700-1707.

- WAGNER M., AMANN R., LEMMER H. & SCHLEIFER K.H. (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(5):1520-1525.
- WAGNER M., ERHART R., MANZ W., AMANN R., LEMMER H., WEDI D. & SCHLEIFER K.H. (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(3): 792-800.
- WAGNER M. (1995) Die Anwendung von *in situ* Hybridisierungssonden zur Aufklärung mikrobieller Populationsstrukturen in der Abwasserreinigung, Dissertation, TU München.
- WAGNER M., RATH G., KOOPS H.-P., FLOOD J. & AMANN R. (1996) *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* 34(1-2): 237-244.
- WAGNER M. & AMANN R. (1998) Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Envir. Microbiol.* 64(9): 3480-3485.
- WAGNER M. & LOY A. (2002) Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(3): 218-227.
- WAGNER M., LOY A., NOGUEIRA R., PURKHOLD U., LEE N., DAIMS H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4): 665-680.
- WALLNER G., AMANN R. & BEISKER W. (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. 14(2):136-143.
- WALLNER G., ERHART R. & AMANN R. (1995) Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1859-1866.
- WEISS P., SCHWEITZER B., AMANN R. & SIMON M. (1998) Identification *in situ* and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6): 1998-2005.
- WELTIN D., HOFFMEISTER D. & KÄMPFER P. (1996) Studies on polyphosphate and poly- β -hydroxyalkanoate accumulation in *Acinetobacter johnsonii* 120 and some other bacteria from activated sludge in batch and continuous culture. *Acta Biotechnol.* 16: 91-102.
- WENTZEL M.C., LÖTTER L.H., LOWENTHAL R.E. & MARAIS G.V.R. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* ssp. in enhanced biological phosphorus removal – a biochemical model. *Water SA* 12: 209-224.
- WINTZINGERODE F.V., GOEBEL U.B. & STACKEBRANDT E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21(3): 213-229.

- WOBUS A., RÖSKE K. & RÖSKE I. (2000) Investigations of spatial and temporal gradients in fixed-bed biofilms reactors for wastewater treatment. In: FLEMMING H.-C., SZEWZYK U. & GRIEBE T. (eds.) Biofilms. Technomic Publishing Company, Lancaster, 165-194.
- WOESE C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.
- WOESE C.R., WEISBURG W.G., PASTER B.J., HAHN C.M., TANNER R.S., KRIEG N.R., KOOPS H.P. & HARM H. (1985) The phylogeny of purple bacteria: The beta subdivision. System. Appl. Microbiol. 5: 327-336.
- ZARDA B., HAHN D., CHATZINOTAS A., SCHÖNHUBER W., NEEF A., AMANN R.I. & ZEYER J. (1997). Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridisation. Archives of Microbiology 168(3): 185-192.
- ZILLES J.L., PECCIA J., KIM M.-W., HUNG C.-H. & NOGUERA D.R. (2002) Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 68(6) : 2763-2769.

Anhang A-1: Liste der eingesetzten Oligonukleotidsonden

Sonde	Spezifität	Sequenz (5' - 3')	Referenz
EUB338	<i>Eubacteria</i>	CTGCCTCCCGTAGGAGT	AMANN et al., 1990
NONEUB	NON- <i>Eubacteria</i>	CGACGGAGGGCATCCTCA	AMANN et al., 1990
ALF1b	α -Gruppe der Proteobacteria	CGTTCGYTCTGAGCCAG	MANZ et al., 1992
BET42a	β -Gruppe der Proteobacteria	GCCTTCCCACCTTCGTTT	MANZ et al., 1992
GAM42a	γ -Gruppe der Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	MANZ et al., 1992
CF319	Vertreter der Cytophaga/ Flavobacteria-Gruppe	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	MANZ et al., 1994
HGC69a	Grampositive Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt	TATAGTTACCACGCCGT	MANZ et al., 1994
Pla46	<i>Planctomycetales</i>	GACTTGCATGCCTAATCC	NEEF et al., 1998
GNSB941	<i>Green non sulfur bacteria</i> und Verwandte	AAACCACACGCTCCGCT	GICH et al., 2001
MP2	<i>Micrococcus phosphorus</i>	GAGCAAGCTCTTCTGAACCG	KAWAHARASAKI et al., 1998
PAO846	PAO-Cluster (<i>Rhodocyclus</i> spp.)	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	CROCETTI et al., 2000
Actino1011	Klone Ebpr 19 und 20 (<i>T. japonica</i> , AF125092)	TTGCGGGGCACCCATCTCT	LIU et al., 2001
ACA23	<i>Acinetobacter spec.</i>	ATCCTCTCCCATCTCTA	WAGNER et al., 1994
21N23a	Eikelboom Typ 021N	TCCCTCTCCCAAATTCTA	WAGNER, 1995
NEU	<i>Nitrosomonas spec.</i>	CCCCTCTGCTGCACTCTA	WAGNER, 1995
Nsm156	<i>Nitrosomonas spec.</i>	TATTAGCACATCTTTTCGAT	MOBARRY et al., 1996
Nso190	Ammonium oxidierende Bakt.	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	MOBARRY et al., 1996
Nso1225	Ammonium oxidierende Bakt.	CGCGATTGTATTACGTGTGA	MOBARRY et al., 1996
Nstp1026	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	AGCACGCTGGTATTGCTA	JURETSCHKO et al. 1998

HHY23a	<i>Haliscomenobacter spec.</i>	GCCTACCTCAACCTGATT	WAGNER, 1995
LDI23a	<i>Leptothrix discophora</i>	CTCTGCCGCACTCCAGCT	WAGNER, 1995
MNP1	Nocardioforme Actinomyceten	TTAGACCCAGTTTCCCAG	SCHUPPLER, 1995
Sna23	<i>Sphaerotilus spec.</i> , <i>Sphaerotilus natans</i> , <i>Eikelboom Typ 1701</i> , <i>Leptothrix cholodnii</i> , (<i>Leptothrix discophora</i>)	CATCCCCCTCTACCGTAC	WAGNER, 1995
TNI23a	<i>Thiothrix nivea</i>	CTCCTCTCCCACATTCTA	WAGNER, 1995

DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. I. Röske für ihre stets freundliche und fachliche Unterstützung der Arbeit herzlich bedanken. Darüber hinaus danke ich ihr für die persönliche Förderung, die sie mir im Verlauf meiner Tätigkeit am Institut erwiesen hat.

Herrn Prof. D. Uhlmann möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die vielen fachlichen Anregungen, die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die Zeit, die er meiner Arbeit in vielerlei Hinsicht geopfert hat, danken.

Herrn Dr. M. Schuppler danke ich für seine fachliche Unterstützung bei der Durchführung der molekularen Arbeiten und seine stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion.

Herrn Dr. K. Kermer möchte ich für die geduldige und kritische Korrektur des Manuskripts und die wertvollen Anmerkungen danken.

Herrn Werner Leipold gilt mein besonderer Dank für die tatkräftige Unterstützung beim Bau und dem Betrieb der Versuchsanlagen. Nicht zuletzt dank seines Engagements war ein „fast“ reibungsloser Betrieb der Versuchsanlagen möglich. Frau J. Bieder danke ich für die zuverlässige Durchführung der chemischen Analysen und der Bewältigung kleinerer und größerer Pannen an den Versuchsanlagen.

Herrn Prof. E. Jacobs danke ich für die Möglichkeit, die molekularbiologischen Arbeiten am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene durchführen zu dürfen. Zudem möchte ich Frau Dipl. Biol. Catrin Bleul, Frau Silke Rachlitz und Frau Susanne Thomas für ihre Unterstützung im Labor und das stets gute Arbeitsklima danken.

Mein Dank gilt natürlich auch allen jetzigen und ehemaligen Kollegen am Institut für Mikrobiologie für das angenehme Arbeitsklima. Bei Frau Dr. Christiane Schönborn möchte ich für die fachlichen und technischen Anregungen und der angenehmen Arbeitsatmosphäre in Bad Liebenwerda danken. Herrn Dipl. Biol. Frank Ludwig danke ich für seine Mithilfe bei der Auswertung meiner T-RFLP-Daten am Mac. Herrn Dipl. Biol. Karsten Rinke danke ich stellvertretend für alle studentischen Hilfskräfte, die mich bei der Auswertung der FISH-Analyse unterstützt haben.

Den Mitarbeitern der Stadtwerke Elsterwerda Herrn Grünberg, Herrn Bronk und Herrn Robitz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft beim Betrieb der Versuchsanlagen auf der Kläranlage Bad Liebenwerda und der Bereitstellung der technischen Daten der Kläranlagen Elsterwerda und Bad Liebenwerda.

Meinen Eltern danke ich für die mir immer gewährte Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Ursula für ihre persönliche Unterstützung und die zahlreichen Korrekturlesungen bedanken.